

帕金森病肠功能分析及 CXCR4 在肠神经系统中的表达

张静¹, 暴丽华^{1,2}, 吴金涛¹, 李贵宝¹, 刘海莉¹, 岳庆伟¹,
朱德晓¹, 孙东¹, 宋守阳¹, 丁兆习¹, 孙晋浩¹

(1. 山东大学医学院人体解剖学教研室, 山东 济南 250012; 2. 长治市人民医院神经内科, 山西 长治 046000)

摘要: **目的** 研究帕金森病(PD)大鼠肠功能的改变,探讨趋化因子 CXCL12 受体 CXCR4 在肠神经系统中的功能及作用机制。**方法** 将 20 只 SD 大鼠随机分为 6-OHDA 组和对照组。6-OHDA 组经 6-OHDA 脑内定点注射建立 PD 动物模型,建模 4 周后收集两组大鼠 1 h 粪便排出量,计算粪便含水量。利用免疫荧光染色法检测胃肠神经细胞 CXCR4 表达的变化。**结果** 与对照组相比,6-OHDA 组大鼠 1 h 粪便排出量及含水量明显降低($P < 0.01$),而且胃肠神经组织中 CXCR4 阳性细胞数量明显减少,但荧光强度显著增强($P < 0.01$)。**结论** PD 大鼠胃肠神经系统中 CXCR4 表达水平降低与其胃肠功能障碍密切相关。

关键词: 帕金森病;肠神经系统;6-OHDA;CXCR4

中图分类号: R742.5 **文献标志码:** A

Intestinal function analysis in Parkinson's disease and the expression of CXCR4 in the enteric nervous system

ZHANG Jing¹, BAO Lihua^{1,2}, WU Jintao¹, LI Guibao¹, LIU Haili¹, YUE Qingwei¹,
ZHU Dexiao¹, SUN Dong¹, SONG Shouyang¹, DING Zhaoxi¹, SUN Jinhao¹

(1. Department of Human Anatomy, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;
2. Department of Neurology, the People's Hospital of Changzhi, Changzhi 046000, Shanxi, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of intestinal function in rats with Parkinson's disease (PD) and explore the function and mechanism of CXCL12/CXCR4 in enteric nervous systems. **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into 6-OHDA group and control group. In 6-OHDA group, SD rats were treated with 6-OHDA to establish PD model. Four weeks later, the one-hour fecal excretion and water content of the feces in two groups were measured. In addition, the expression of CXCR4 in the gastrointestinal nerve plexus was detected by immunofluorescent staining. **Results**

Compared with those in the control group, the one-hour fecal excretion and water content of the feces in 6-OHDA group were significantly decreased ($P < 0.01$). In 6-OHDA group, the number of CXCR4-positive cells in gastrointestinal nerve plexus was obviously decreased while the fluorescence intensity was increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Gastrointestinal dysfunction of PD rats may be related to the decreasing expression of CXCR4 in the enteric nervous systems.

Key words: Parkinson's disease; Enteric nervous systems; 6-OHDA; CXCR4

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是老年人常见的神经退行性病,主要病理改变为脑内黑质和纹状体通路进行性退变。随着社会老龄化,PD患病率

明显升高,目前尚无有效治疗办法^[1]。PD除了有震颤、僵直等运动障碍外,常伴有认知、睡眠、便秘等非运动障碍。其中便秘是PD最常见的非运动症状

收稿日期:2013-11-18;网络出版时间:2014-04-10 13:55

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/doi/10.6040/j.issn.16717554.0.2013.692.html>

基金项目:教育部博士点基金(20120131120049);山东省自然科学基金(ZR2012HQ018, ZR2010HM051);山东省科技发展计划(2011GSF11810);山东大学自主创新基金(2012TS113)

通讯作者:孙晋浩。E-mail:sunjinhao@gmail.com

之一,甚至在运动症状前即可出现^[2]。大量研究发现,在PD发病早期,患者即可出现明显的胃肠神经功能紊乱等非运动症状,如消化道运动迟滞、顽固性便秘等^[3-5],严重影响了患者的生活质量^[6]。然而PD患者胃肠功能紊乱的机制尚不明确。研究PD肠神经系统病变的发生和发展,不仅可以为探究PD早期发病机制提供实验依据,也可为探索预防和改善肠神经系统功能紊乱的治疗靶点,综合治疗PD提供有效方法和理论依据。

研究发现,趋化因子CXCL12及其受体CXCR4可能参与PD的发病机制。PD患者黑质的CXCL12以及多巴胺能神经元上CXCR4表达增高,同时活化的小胶质细胞增多;在MPTP诱导的PD动物模型上则发现黑质先出现CXCL12及CXCR4表达增高,而后才出现多巴胺能神经元减少^[7]。在PD肠神经细胞病理变化过程中,趋化因子CXCL12及其受体CXCR4的作用尚未见报道。本实验拟利用PD动物模型,观察PD大鼠肠功能的改变,探讨CXCL12/CXCR4在肠神经系统中的功能及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 健康雄性SD大鼠20只,体重(200±20)g,购自山东大学实验动物中心,鼠颗粒饲料喂养,常规饮水和照明。随机分为6-OHDA组和对照组,每组10只。

1.1.2 主要试剂与仪器 6-OHDA及阿朴吗啡(apomorphine, APO)购自美国Sigma公司;兔抗鼠CXCR4多克隆抗体、四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethylrhodamineisothiocyanate, TRITC)标记山羊抗兔IgG、正常山羊血清均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 大鼠PD模型的制作 6-OHDA组SD大鼠1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉后,固定于脑立体定位仪上,常规消毒,沿中线纵形切开头皮约1.0 cm,剥离骨膜。选择前囟为定位原点,参照Paxinos Watson大鼠脑立体定位图谱,确定右侧中脑黑质区域定位坐标,前囟后5.0 mm,中线右侧旁2.4 mm,硬脑膜下7.6 mm;注射6-OHDA溶液5 μL(2 μg/μL,溶于含0.2%维生素C的生理盐水中),注射速度为1 μL/min,注药完毕后,留针10 min。再次消毒、缝合皮肤。对照组以相同方法向上述每个坐标点内注射含有0.2%维生素C的生理盐水

5 μL。术后2周,0.1% APO颈部皮下注射,剂量为0.2 mL/只,记录旋转圈数。

1.2.2 尼氏染色造模 12周后,10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉,4%多聚甲醛灌注固定。开颅取脑,置于4%多聚甲醛中后固定6 h,然后移入含20%蔗糖的磷酸缓冲液内过夜。取脑黑质区,-20℃恒冷连续冠状切片。切片PBS洗涤后放入2%硫堇中,37℃染45 min,蒸馏水冲洗后梯度乙醇分化,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.3 大鼠肠功能检测 造模后第28天,6-OHDA组及对照组分别取5只大鼠,收集每只大鼠1 h内排出的粪便,称取粪便湿重;收集的粪便于65℃恒温干燥12 h后再次称取粪便干重,计算粪便含水量:粪便含水量(%)=(粪便湿重-粪便干重)/粪便湿重×100%。

1.2.4 灌注取材切片 造模后第28天,6-OHDA组及对照组分别取5只大鼠,10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉,4%多聚甲醛灌注固定,迅速剖腹,取胃窦及全结肠组织清洗后,放入4%多聚甲醛中固定24 h。PBS清洗3次后,进行10%、20%、30%蔗糖梯度沉糖。用OCT包埋组织,制作恒冷切片,片厚20 μm。

1.2.5 结肠组织CXCR4表达水平的免疫荧光检测 取出切片,PBS清洗3次,每次5 min。10%山羊血清室温封片1 h。滴加兔抗鼠CXCR4一抗(5 μg/mL),4℃孵育过夜。PBS清洗3次,每次5 min。加入TRITC标记的山羊抗兔的IgG二抗(1:100),37℃孵育2 h。PBS清洗3次,每次15 min。95%甘油封固后,荧光显微镜观察并拍照。以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 统计学处理 使用SPSS 17.0软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD模型鼠行为变化 对照组大鼠注射APO不能诱发旋转行为。而6-OHDA组大鼠术后第2周注射APO即可诱发明显旋转行为,表现为向健侧的首尾相接状旋转。旋转圈数可达9转/min以上,并保持稳定。

2.2 尼氏染色结果 健侧黑质区可见大量多角形神经元,轮廓清晰,胞体大,核圆,胞浆内充满蓝紫色尼氏小体,见图1A。毁损区神经元数量明显减少,大部分神经元丢失,尼氏小体消失,细胞轮廓不清,见图1B。

两侧比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

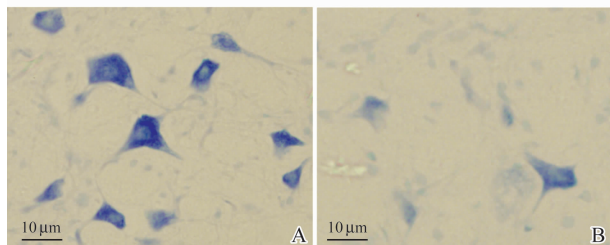


图1 PD模型鼠黑质尼氏染色

A: 健侧黑质区可见较多神经元,胞浆内含大量尼氏体; B: 毁损侧黑质区见多数神经元死亡,胞浆内尼氏体消失。

Fig. 1 Nissl's staining of the substantia nigra of the PD model rat

A: A large number of neurons could be found in the substantia nigra of uninjured side; B: In the substantia nigra of injured side, the neurons were strongly insulted and severe cell loss could be observed.

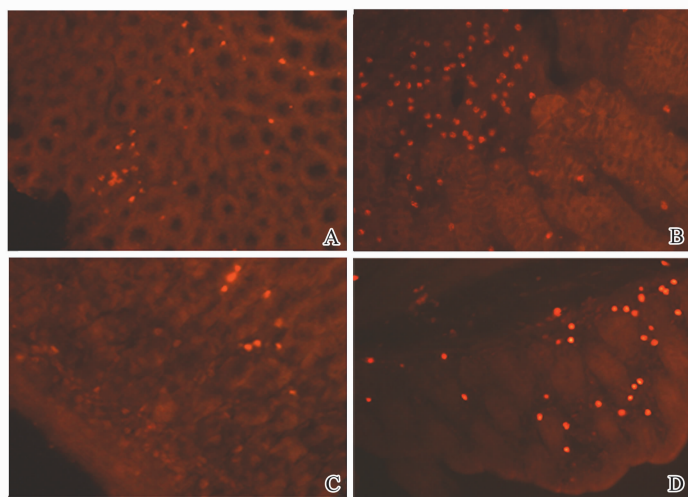


图2 CXCR4在胃窦及结肠组织中的表达(免疫荧光检测, $\times 200$)

A: 对照组胃窦; B: 对照组结肠; C: 6-OHDA组胃窦; D: 6-OHDA组结肠; E: 两组阳性细胞数比较($*P < 0.01$); F: 两组荧光强度比较($*P < 0.01$)。

Fig. 2 The expression of CXCR4 in sinuses ventriculi and colon (immunofluorescent staining, $\times 200$)

A: The sinuses ventriculi of the control group; B: The colon of the control group; C: The sinuses ventriculi of the 6-OHDA group; D: The colon of the 6-OHDA group; E: The number of the positive cells in two groups ($*P < 0.01$); F: The fluorescence intensity in two groups ($*P < 0.01$).

3 讨论

PD是一种多系统受累的神经营养性疾病,其病因及发病机制不明。传统观念认为,PD神经系统变性始于黑质的多巴胺系统,然而越来越多的学者对此提出了不同的观点。Braak等^[3]认为,外源性病原体通过周围神经进入嗅球以及肠道黏膜,引起 α 突触核蛋白沉积,然后借助于神经元之间的轴突连接及信号途径,诱发中枢神经系统 α 突触核蛋白沉积,导致神经元变性死亡。大量研究证实,在PD发病早期,从消化道运动迟滞到顽固性便秘等胃肠功能紊乱的症状已成为明显的临床表现,严重影响

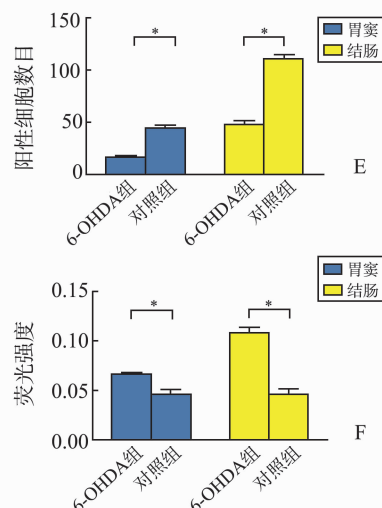
2.3 1 h 粪便排出量及含水量 见表1。6-OHDA鼠1 h 粪便排出量及含水量均明显减少,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 1 h 粪便排出量及含水量比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	粪便排出量(g)	粪便含水量(%)
6-OHDA组	$0.80 \pm 0.34^*$	$20.20 \pm 4.56^*$
对照组	1.62 ± 0.31	42.01 ± 3.21

* $P < 0.01$ vs 对照组。

2.4 CXCR4 免疫荧光染色结果 对照组大鼠胃窦及结肠组织中可见大量CXCR4阳性细胞,主要分布于黏膜下腺体之间和肌层,见图2A、2B,而6-OHDA组大鼠胃肠肌间神经组织中CXCR4阳性细胞数量则明显减少,但细胞荧光强度明显增强,见图2C、2D。两组差异有统计学意义($P < 0.01$),见图2E、2F。



响患者的生活质量^[4,8],且不能用左旋多巴缓解^[9]。本研究利用PD动物模型探讨趋化因子受体CXCR4与PD肠神经系统病变的关系。

调控胃肠功能的神经网络十分复杂,包括中枢神经系统、自主神经系统和肠神经系统。肠神经系统由肠壁内肌间神经丛和黏膜下神经丛共同构成,可独立调节胃肠道功能^[10-11]。研究证实,胃肠功能紊乱是肠神经系统和迷走神经背侧运动核异常的表现^[8,12-13]。在PD的非运动症状中,便秘是最常见的胃肠道症状,见于70%~80%的PD患者^[14]。我们的研究结果显示,PD模型鼠在造模后28 d粪便排出量及含水量均明显减少,与对照组相比差异有统计学意义,提示可能出现肠道蠕动减弱,结肠运输时

间延长,粪便在结肠中滞留时间过长,水分被肠黏膜大量吸收,粪便干燥,含水量减少。Jost 等^[15]也发现,在 PD 患者中,约有 80% 存在结肠传输时间延长。然而 PD 患者伴发便秘的机制尚不明确,可能与胃肠蠕动减少、肠神经丛神经元变性、多巴胺受体激动剂和抗胆碱能药物的使用有关^[16]。有证据表明,随着胃肠蠕动受损,PD 肠神经系统中会出现 α 突触核蛋白沉积、路易氏小体和路易神经索^[3,17],提示肠神经系统可能存在神经元的变性、神经递质的改变。

趋化因子是一些小分子量分泌蛋白质,能够吸引白细胞移行到感染部位(如 IL-8、MCP-1 等),在炎症反应中具有重要作用。其中趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 在神经组织中不仅参与多种神经细胞的迁移、轴突生长、神经递质传递等生理作用,也参与了神经系统的炎症反应。CXCR4 广泛表达于胚胎及成年后的中枢神经来源的神经前体细胞^[18],影响神经干细胞的迁移和增殖^[19-20],诱导神经嵴细胞迁移,形成背根神经节和交感神经节两个功能各异的结构^[21],并诱导颅面部神经嵴源性细胞正确迁移^[22]。大量研究表明,在脑肿瘤、脑缺血、HIV 病毒性脑炎等脑组织损伤中,CXCL12 及 CXCR4 表达明显升高^[23-25]。CXCR4 途径被激活后,可通过 G 蛋白偶联信号转导途径,使细胞内钙离子浓度增加,进而诱发神经元凋亡^[26]。研究证实,PD 患者的黑质 CXCL12 以及其受体 CXCR4 表达增高,并伴有活化的小胶质细胞增多,在 MPTP 诱导的 PD 动物模型上发现黑质先出现 CXCL12 及 CXCR4 的表达增高,而后才出现多巴胺能神经元的减少^[7],提示 CXCL12 及其受体 CXCR4 可能参与 PD 的发病机制。我们的研究结果显示,正常大鼠胃窦及结肠的黏膜下腺体之间和肌层组织中可见大量 CXCR4 阳性细胞,而 PD 大鼠胃肠神经组织中 CXCR4 阳性细胞数量则明显减少,但细胞荧光强度显著增强,与正常对照组相比差异有统计学意义,表明 PD 大鼠胃肠神经组织中出现了 CXCR4 阳性细胞的丢失,这种丢失可能与 PD 的肠神经系统功能紊乱密切相关。

总之,6-OHDA 诱导的 PD 大鼠存在明显的便秘,这可能与肠神经系统中神经元 CXCR4 表达增强有关。我们推测,过量表达的 CXCR4 与配体结合后,可能通过改变下游分子的表达而诱发胃肠神经细胞的变性,导致便秘发生。干预趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 的作用途径,可能成为治疗 PD 的新思路。

参考文献:

- [1] Lunn J S, Sakowski S A, Hur J, et al. Stem cell technology for neurodegenerative diseases [J]. *Ann Neurol*, 2011, 70(3):353-361.
- [2] Soykan I, Lin Z, Bennett J P, et al. Gastric myoelectrical activity in patients with parkinson's disease: evidence of a primary gastric abnormality [J]. *Dig Dis Sci*, 1999, 44(5):927-931.
- [3] Braak H, de Vos R A, Bohl J, et al. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 396(1):67-72.
- [4] Cersosimo M G, Benarroch E E. Pathological correlates of gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(3):559-564.
- [5] Pfeiffer R F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2011, 17(1):10-15.
- [6] Salawu F K, Danburam A, Olokoba A B. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management [J]. *Niger J Med*, 2010, 19(2):126-131.
- [7] Shimoji M, Pagan F, Heaton E B, et al. CXCR4 and CXCL12 expression is increased in the nigro-striatal system of Parkinson's disease [J]. *Neurotox Res*, 2009, 16(3):318-328.
- [8] Del Tredici K, Jost W H. Gastrointestinal dysfunction in idiopathic Parkinson's disease [J]. *Nervenarzt*, 2012, 83(10):1282-1291.
- [9] Heaton Z S, Quigley E M. Gastroparesis and Parkinson's disease: a systematic review [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012, 18(5):433-440.
- [10] Ciesielczyk K, Thor P J. Neural control disturbances of the gastrointestinal tract and visceral pain in inflammatory bowel diseases [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, 67:304-314.
- [11] Furness J B. The enteric nervous system and neurogastroenterology [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(5):286-294.
- [12] Cersosimo M G, Perandones C, Micheli F E, et al. Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients [J]. *Mov Disord*, 2011, 26(1):188-190.
- [13] Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9):e12728. doi:10.1371/journal.pone.0012728.
- [14] Sakakibara R, Shinotoh H, Uchiyama T, et al. Ques-

- tionnaire-based assessment of pelvic organ dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Auton Neurosci*, 2001, 92(1): 76-85.
- [15] Jost W H, Schimrigk K. Constipation in Parkinson's disease[J]. *Klin Wochenschr*, 1991, 69(20):906-909.
- [16] Abbott R D, Petrovitch H, White L R, et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease[J]. *Neurology*, 2001, 57(3):456-462.
- [17] Drolet R E, Cannon J R, Montero L, et al. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 36(1):96-102.
- [18] Tran P B, Ren D, Veldhouse T J, et al. Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 76(1): 20-34.
- [19] Zaruba M M, Franz W M. Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(3):321-335.
- [20] Carbajal K S, Schaumburg C, Strieter R, et al. Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(24):11068-11073.
- [21] Kasemeier-Kulesa J C, McLennan R, Romine M H, et al. CXCR4 controls ventral migration of sympathetic precursor cells[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(39):13078-13088.
- [22] Olesnický Killian E C, Birkholz D A, Artinger K B. A role for chemokine signaling in neural crest cell migration and craniofacial development[J]. *Dev Biol*, 2009, 333(1):161-172.
- [23] Yang L, Jackson E, Woerner B M, et al. Blocking CXCR4-mediated cyclic AMP suppression inhibits brain tumor growth in vivo[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 651-658.
- [24] Miller J T, Bartley J H, Wimborne H J, et al. The neuroblast and angioblastchemotactic factor SDF-1 (CXCL12) expression is briefly up regulated by reactive astrocytes in brain following neonatal hypoxic-ischemic injury [J]. *BMC Neurosci*, 2005, 6:63.
- [25] Mocchetti I, Bachis A, Masliah E. Chemokine receptors and neurotrophic factors: potential therapy against aids dementia? [J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(2):243-255.
- [26] Bachis A, Mocchetti I. The chemokine receptor CXCR4 and not the N-methyl-D-aspartate receptor mediates gp120 neurotoxicity in cerebellar granule cells [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 75(1):75-82.
- (编辑:周英智)
- (上接第24页)
- [5] Astrup J, Siesjo B K, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra [J]. *Stroke*, 1981, 12(6):723-725.
- [6] Wardlaw J M, Murray V, Berge E, et al. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet*, 2012, 379(9834):2364-2372.
- [7] Meng W, Wang X, Asahi M, et al. Effects of tissue plasminogen activator in embolic versus mechanical models of focal cerebral ischemia in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19(12):1316-1321.
- [8] Du Y, Shi L, Li J, et al. Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area were detected after electroacupuncture treatment to rats with ischemic stroke[J]. *Neurol Res*, 2011, 33(1):101-107.
- [9] Seevinck P R, Deddens L H, Dijkhuizen R M. Magnetic resonance imaging of brain angiogenesis after stroke[J]. *Angiogenesis*, 2010, 13(2):101-111.
- [10] 潘经锐, 王艺东, 李梅, 等. 大鼠脑梗死后缺氧组织变化与血管增生的关系[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(10):1926-1930.
- [11] Greenberg D A, Jin K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(10):1753-1761.
- [12] Rossi B, Angiari S, Zenaro E, et al. Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions [J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 89(4):539-556.
- [13] Frechou M, Beray-Berthat V, Raynaud J S, et al. Detection of vascular cell adhesion molecule-1 expression with USPIO-enhanced molecular MRI in a mouse model of cerebral ischemia[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2013, 8(2):157-164.
- [14] Yang J T, Lee T H, Lee I N, et al. Dexamethasone inhibits ICAM-1 and MMP-9 expression and reduces brain edema in intracerebral hemorrhagic rats[J]. *Acta Neurochir*, 2011, 153(11):2197-2203.
- [15] Mehta S L, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1):34-66.
- [16] Montaner J, Salat D, García-Berrocó T, et al. Reperfusion therapy for acute stroke improves outcome by decreasing neuroinflammation [J]. *Transl Stroke Res*, 2010, 1(4):261-267.
- (编辑:徐苗蓁)