

文章编号:1003-2754(2020)04-0326-04

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbz.2020.0332

星形胶质细胞在帕金森大鼠中的作用机制研究

李承家¹, 秦丽红², 李承泽¹, 龚张馨¹, 陈洋¹, 王辰²

摘要: **目的** 观察移植星形胶质细胞后的 PD 大鼠行为学改变和单胺类神经递质含量的时空变化及相互关系,旨在分析星形胶质细胞在帕金森大鼠中的作用机制。**方法** 偏侧两点法建立 PD 模型大鼠后,将星形胶质细胞移入 PD 大鼠纹状体中,2 w 后对比 PD 组,观察行为学改变,检测单胺类神经递质(DA、DOPAC、HVA)含量变化。**结果** PD + T2As 组的行为学从第 4 周开始较 PD 组有显著改善($P < 0.01$),单胺类神经递质(DA、DOPAC、HVA)含量与 PD 组比较第 2 周无明显区别($P > 0.05$),从第 3 周开始显著高于 PD 组($P < 0.01$)。**结论** 星形胶质细胞在一定程度上保护了受损的 DA 能神经细胞,对 PD 大鼠的黑质-纹状体通路具有修复作用。

关键词: 星形胶质细胞; 单胺类神经递质; 帕金森病

中图分类号:R742.5

文献标识码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The research on the mechanism of action of astrocytes in the rat with Parkinson's disease LI Chengjia, QIN Lihong, LI Chengze, et al. (Clinical Medical School of Jiamusi University, Jiamusi 154002, China)

Abstract: **Objective** To analyze role of astrocytes and mechanisms on Parkinson's disease in rats by analyzing the behavior changes and the changes of monoamine neurotransmitter in rat with Parkinson's disease who were transplanted astrocytes. **Methods** To test behavior change, and detect monoamine neurotransmitter (DA, DOPAC and HVA) changes in the PD + T2As group and PD group in two weeks after transplant astrocytes to the PD rat striatum. **Results** The behavior of mice in PD + T2As group was improved significantly compared to mice in PD group after 4 weeks ($P < 0.01$), and the levels of monoamine neurotransmitter (DA, DOPAC and HVA) were significantly higher than those in PD group in 3 weeks ($P < 0.01$). **Conclusion** Astrocytes have repair and protective role in PD via the nigra striatum pathways.

Key words: Astrocytes; Parkinson's disease; Monoamine neurotransmitter

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见于中老年的神经系统变性疾病,主要病理改变为黑质-纹状体多巴胺能通路变性。黑质纹状体多巴胺能神经元死亡,多巴胺分泌减少是帕金森病的一个重要病理特征。星形胶质细胞是胶质细胞的一种,是脑内最广泛的一类细胞。它们伸展充填在神经细胞的胞体及其突起之间,起支持、保护和分隔神经细胞的作用。星形胶质细胞在大脑中还有许多更加重要复杂的功能。而目前研究表明^[1,2],星形胶质细胞在 PD 病变过程中发挥着重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选取由佳木斯大学动物中心提供健康雄性 SD 大鼠 130 只,月龄 2.5 ~ 3 m,体重 210 ~ 240 g,健康情况良好,用于 PD 大鼠模型 100 只,其中 50 只移入 2 型星形胶质细胞(type 2 Astrocytes T2As)为 PD + T2As 组,余 50 只 PD 大鼠注射等量的生理盐水于纹状体为 PD 组;正常大鼠 30 只,注射等量的生理盐水于正常 SD 大鼠纹状体中,为对照组。

1.2 帕金森病大鼠模型的制备 给予 SD 大鼠腹腔注射 4% 的水合氯醛,麻醉后,固定于立体定向仪。使十字点前角和人字点后角相平,当门齿杆位置低于水平 0 度时,则颅骨水平位达成。在颅骨表面注药点处钻 1 个约 2 mm 的小孔。分别在以下两点处各注入 10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ 含 0.2% 抗坏血酸的 6-OHDA 盐溶液。第一点:前角前 1 mm,中线右侧 3.0 mm,硬膜下 5 mm;第二点:前角后 0.2 mm,中线右侧 + 2.6 mm,硬膜下 6.0 mm。速度为 1 $\mu\text{g}/\text{min}$,注射后留置 4 min 退出,缝合皮肤,碘酒擦拭缝合处。每天腹腔给予 20 万 U 青霉素,共 7 d 以预防感染。模型建立 2 w 后,用阿朴吗啡(apomn-

收稿日期:2019-12-11;修订日期:2020-01-30

基金项目:佳木斯大学大学生创新创业项目库训练项目(No. 2019xj02)

作者单位:(1. 佳木斯大学临床医学院,黑龙江 佳木斯 154002;2. 佳木斯大学附属第一医院神经内科,黑龙江 佳木斯 154002)

通讯作者:王辰, E-mail: freesky518317@163.com

phine, APO) 诱发旋转, 选 210 转/30 min 以上的动物为成功 PD 模型。对照组以生理盐水代替 6-OH-DA 盐溶液, 其余步骤与模型制作组相同。

1.3 T2As 的分离纯化及移植 取大鼠皮质分散, 用 0.125% 的胰酶消化 7 min (37 °C), 加含 15% 胎牛血清的完全培养基终止胰酶的消化作用, 吸管反复吹打至细胞分散, 得到单细胞悬液。以 $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种于培养瓶中, 于培养箱中孵育 30 min, 以去除成纤维细胞。吸出细胞悬液, 再接种于 5% CO₂ 培养箱中培养。收集未贴壁的 O-2A 祖细胞用筛网过滤, 滤液经 1000 rpm 离心 5 min, 倒掉上清液, 细胞因子培养液重悬后接种于 PLL 包被的六孔培养板中。将分离纯化的 O-2A 祖细胞放于含 20% FCS 的培养液中培养 3 d, 即可分化为 T2As。将分离纯化的 T2As 移植入 PD 大鼠的患侧纹状体, 步骤与模型制作组相同。

1.4 单胺类递质含量的测定 行为学实验结束后, 每周分别随机选择 10 只大鼠, 行单胺类递质含量的测定取大鼠纹状体, 液氮冷冻后存于 -80 °C 冰箱。样品处理: 纹状体组织准确称重, 按照 1: 10 的比例加入 0.4 mol/L 高氯酸, 除去蛋白, 高速冷冻离心机 12000 r/min 4 °C 离心 15 min。取上清, 再置于 12000 r/min 4 °C 离心 20 min。取上清液加样行, 应用高效液相色谱-电化学法测定各组大鼠纹状体内多巴胺含量, 检测各样品的多巴胺 (DA), DA 的代谢产物 3,4 二羟基苯乙酸 (DOPAC) 和高香芳酸 (HVA) 的含量。用外标法定量, 以峰面积表示其含量。

1.5 统计学分析 实验数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 采用的检验方法计量资料的比较, 采用两独立样本 *t* 检验, 组内多重计量资料的比较 (采用单因素方差分析及 Bonfferoni *t* 检验), 认为 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠旋转行为的旋转速度、维持时间测定

注射 APO 后诱导的旋转行为表现为: 头部和躯干弯向健侧 (左侧) 旋转, 伴有震颤、咬尾足、尾部僵直等异常行为。健康对照组无旋转行为。PD 组出现明显的旋转行为, 各周均数采用 Bonfferoni *t* 检验, 发现术后 4 w 达到较高水平, 与第 2 周、第 3 周相比升高明显 ($P < 0.01$), PD + T2As 组在第 4 ~ 6 周, 与 PD 组比较旋转速度明显降低 ($P < 0.01$) (见表 1), 大鼠维持旋转行为的时间叫维持时间。PD 组旋转时间逐渐升高, 到第 4 周后趋于稳定, PD + T2As 组在第 4 ~ 6 周, 与 PD 组比较旋转速度明显降低 ($P < 0.01$) (见表 2)。

2.2 大鼠单胺类神经递质 (DA、DOPAC、HVA) 的含量变化 健康对照组单胺类神经递质 (DA、DOPAC、HVA) 各周比较均无明显差别 ($P > 0.05$), PD 组与对照组比较单胺类神经递质 (DA、DOPAC、HVA) 明显低于对照组 ($P < 0.01$), 移植 T2As 后, DA、DOPAC、HVA 含量逐渐升高, 在第 4 周开始与第 2 周相比具有明显区别 ($P < 0.01$)。在第 3 周开始均明显高于 PD 组 ($P < 0.01$) (见表 3 ~ 表 5)。

表 1 大鼠每周的旋转速度 ($\bar{x} \pm s$, 转/分)

组别	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w
对照组	-	-	-	-	-
PD 组	8.84 \pm 1.04	9.46 \pm 1.32	12.97 \pm 1.51	13.57 \pm 1.61	13.91 \pm 1.87
PD + T2As 组	8.91 \pm 1.21*	8.84 \pm 1.46*	7.64 \pm 1.81 [#]	7.15 \pm 1.74 [#]	6.24 \pm 1.91 [#]

与 PD 组比较 * $P > 0.05$; 与 PD 组比较[#] $P < 0.01$

表 2 大鼠旋转行为的维持时间 ($\bar{x} \pm s$, min)

组别	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w
对照组	-	-	-	-	-
PD 组	51.29 \pm 4.90	57.70 \pm 5.51	66.12 \pm 4.21	68.72 \pm 5.19	68.10 \pm 6.17
PD + T2As 组	51.09 \pm 5.21*	50.84 \pm 5.06*	45.42 \pm 4.54 [#]	43.64 \pm 6.11 [#]	42.24 \pm 4.91 [#]

与 PD 组比较 * $P > 0.05$; 与 PD 组比较[#] $P < 0.01$

表 3 大鼠纹状体部位的 DA 含量变化($\bar{x} \pm s, \text{ng/g}$)

组别	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w
对照组	9.46 ± 0.15	9.51 ± 0.32	9.49 ± 0.21	9.60 ± 0.19	9.55 ± 0.25
PD 组	3.62 ± 0.20 [◇]	1.92 ± 0.57 [◇]	1.56 ± 0.34 [◇]	1.05 ± 0.17 [◇]	0.94 ± 0.14 [◇]
PD + T2As 组	3.98 ± 0.45 [*]	4.09 ± 0.71 [#]	4.84 ± 0.25 ^{#△}	4.91 ± 0.41 ^{#△}	5.01 ± 0.27 ^{#△}

与对照组比较[◇] $P < 0.01$;与 PD 组比较^{*} $P > 0.05$;与 PD 组比较[#] $P < 0.01$;与同组第 2 周、第 3 周比较均 $\Delta P < 0.01$

表 4 大鼠纹状体部位的 DOPAC 含量变化($\bar{x} \pm s, \text{ng/g}$)

组别	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w
对照组	0.32 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.03
PD 组	0.14 ± 0.03 [◇]	0.10 ± 0.03 [◇]	0.06 ± 0.01 [◇]	0.05 ± 0.01 [◇]	0.05 ± 0.01 [◇]
PD + T2As 组	0.15 ± 0.03 [*]	0.16 ± 0.02 [#]	0.20 ± 0.04 ^{#△}	0.21 ± 0.02 ^{#△}	0.21 ± 0.03 ^{#△}

与对照组比较[◇] $P < 0.01$;与 PD 组比较^{*} $P > 0.05$;与 PD 组比较[#] $P < 0.01$;与同组第 2 周、第 3 周比较 $\Delta P < 0.01$

表 5 大鼠纹状体部位的 HVA 含量的变化($\bar{x} \pm s, \text{ng/g}$)

组别	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w
对照组	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.06	0.17 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.03
PD 组	0.08 ± 0.02 [◇]	0.07 ± 0.02 [◇]	0.05 ± 0.01 [◇]	0.02 ± 0.00 [◇]	0.02 ± 0.00 [◇]
PD + T2As 组	0.09 ± 0.02 [*]	0.10 ± 0.02 [#]	0.11 ± 0.02 ^{#△}	0.12 ± 0.01 ^{#△}	0.12 ± 0.01 ^{#△}

与对照组比较[◇] $P < 0.01$;与 PD 组比较^{*} $P > 0.05$;与 PD 组比较[#] $P < 0.01$;与同组第 2 周比较 $\Delta P < 0.01$

3 讨 论

在中枢神经系统神经元的发育过程中,星形胶质细胞(astrocyte, As)始终伴随着其发育过程,不仅能起到支持和隔离的作用,还能起到调节细胞内外离子浓度、摄取、供给及灭活神经递质、传递第二信使等功能。近年来,有报道^[3,4]星形胶质细胞能分泌神经营养因子及释放可溶性分子,进而保护神经元,对神经损伤具有清除作用。本实验通过建立 PD 大鼠模型后将 2 型星形胶质细胞移植到 PD 大鼠纹状体内,观测 3 组大鼠(PD + T2As 组、PD 组、对照组)行为学改变(启动时间、旋转速度和维持时间),同时观察单胺类神经递质(DA、DOPAC、HVA)在纹状体中的变化,以期探究 2 型星形胶质细胞在 PD 大鼠中的作用。

应用 6-OHDA 建立大鼠 PD 模型的方法,有黑质内注射法、内侧前脑束注射法和纹状体内注射法。纹状体较黑质体积大,注药准确性高,模型更稳定,故本实验采取两点纹状体内注射法,同时损毁尾壳核和苍白球外侧段,损伤更完全,6-OHDA 注入纹状体后,可被多巴胺能神经末梢摄取,逆行性损毁黑质内多巴胺能神经元。此过程是渐进性的,可以模拟 PD 的发病过程。根据实验结果可见 3 组大鼠的旋

转速度、维持时间具有明显区别,对照组明显优于 PD 组和 PD + T2As 组,PD + T2As 组从第 4 周开始较 PD 组有显著改善;单胺类神经递质(DA、DOPAC、HVA)在纹状体中的含量在 3 组中的测定,结果提示从第 3 周开始 PD + T2As 组显著高于 PD 组,PD 组和 PD + T2As 组单胺类神经递质含量在第 2~6 周均低于正常对照组。说明 T2As 对损伤的黑质-纹状体通路具有修复和一定的保护作用,对 PD 损伤侧的多巴胺能神经细胞具有延缓死亡、增加黑质-纹状体 DA 的合成及释放,减慢 DA 分解速度,可能在一定程度保护了损坏的 DA 能神经细胞。

神经组织由神经元和神经胶质细胞组成。在神经胶质细胞中,星形细胞数量最多,分布最广。星形细胞广泛分布于中枢神经系统的灰质和白质,具有神经胶质细胞的大部分功能,如:支持、修复与再生、吞噬与保护、运输营养、参与构成血脑屏障、摄取化学递质和分泌功能等。星形胶质细胞支持、引导神经元,并增强神经元的存活,促进神经元之间形成突触连接。星形细胞又可分为 T1As 和 T2As 两种。在 LPS(一种位于革兰氏阴性细菌细胞壁最外层的类脂多糖类物质,可刺激炎症反应发生)的刺激下,他们观察到静息星形胶质细胞转变为 T1As,后者可以产

生大量的炎症因子。另一方面, T2As 可由缺氧所诱导, 在卒中脑组织附近分泌支持神经元生长, 保证神经元健康及存活物质。星形胶质细胞具有合成和分泌多种细胞因子的功能, 包括可扩散的神经营养因子和非扩散的神经元支持物质, 具有长期营养神经元、短暂刺激轴突生长等作用。分泌的脑源性生长因子、纤维粘连蛋白、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、层粘连蛋白、一氧化氮 (NO)、胶质细胞源性生长因子等, 虽然具体保护的分子机制不清楚, 但这些营养因子能够使 DA 能神经元减少神经毒性物质的损伤, 对 DA 能神经元的营养、再生和分化的重要作用已在大量实验中得到证实。

近年来, 许多研究自由基生成和氧化应激促进了 PD 的发展, DA 自身氧化可产生毒性代谢产物 H_2O_2 , 与铁作用后产生具有高毒性自由基, 研究显示 PD 患者黑质部分的过氧化物含量较多, 受此氧自由基的影响变性的核酸及蛋白变性的数量明显高于健康组, 推测 DA 能神经元暴露于大量活性氧致使 DA 能神经元选择性丢失, 而星形胶质细胞可以产生谷胱甘肽过氧化物酶, 它的作用可以阻止过氧化氢转化为高毒性的羟自由基来达到抗氧化应激而发挥重要神经保护作用, 这种保护作用对易受氧化应激的黑质 DA 能神经元来说尤为重要。研究显示^[5,6]晚期 PD 大鼠黑质部分含谷胱甘肽过氧化物酶阳性的星形胶质细胞密度显著低于健康对照组, 体外培养神经元细胞的过程中也发现星形胶质细胞可以保护神经元免受过氧化物诱导损伤。其作用机制可能是通过 ATP 依赖转运体, NMDA 受体所介导。所以推测星形胶质细胞的抗氧化应激机制参与 PD 神经保护作用。此外, 在 DA 能神经元附近, DA 自身氧化代谢产生的毒性氧自由基会对 DA 能神经元造成损伤, 星形胶质细胞其表达的单胺氧化酶 B (MAO-B) 和儿茶酚胺氧位甲基转移酶 (COMT) 对 DA 的作用代谢而保护仍旧存活神经元, 星形胶质细胞还可以大量摄取细胞外的兴奋氨基酸减少其对黑质的毒性作用以起到保护神经元的目的^[7]。但是, 星形胶

质细胞在某些刺激因素的作用下也可能通过释放一些促炎症因子^[8,9], 如一氧化氮、肿瘤坏死因子- α 等炎症因子对多巴胺能神经元造成损伤而推动帕金森病的发生和发展。

综上所述, 本实验研究发现移植星形胶质细胞后的 PD 大鼠一段时间后行为学明显改善, 脑内单胺类神经递质含量上调明显, 提示星形胶质细胞在 PD 的早期阶段, 在一定程度上保护了黑质-纹状体中受损的 DA 能神经细胞, 保护作用占主导作用。但星形胶质细胞在颅内后期分泌的神经递质, 以及是否可以定向分化为具有其他生理学的神经元, 这些对 DA 能神经元的具体作用仍不清楚, 所以, 我们进一步研究 PD 的不同时期星形胶质细胞的确切作用机制, 对于治疗帕金森病有着重要的意义。

[参考文献]

- [1] Mora F, Segovia G, Del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain[J]. Brain Res Rev, 2007, 55(1): 78-88.
- [2] Yushi U, Shigeyuki Y, Maiko S, et al. Pentobarbitai inhibits 1-DOPA-induced dopamine increases in the rat striatum: An in vivo microdialysis study[J]. Brain Research Bulletin, 2006, 69: 593-596.
- [3] De Virgilio A, Greco A, Fabbri G, et al. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation [J]. Autoimmune Rev, 2016, 15(10): 1005-1011.
- [4] Morales I, Sanchez A, Rodriguez-Sabate C, et al. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0185989.
- [5] Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity[J]. Trends Immunol, 2007, 28(3): 138-145.
- [6] Teismann P. Myeloperoxidase in the neurodegenerative process of Parkinson's disease [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2014, 139(3): 99-102.
- [7] Nowak P, Kostrzewa R, Skaba D, et al. Acute L-DOPA effect on hydroxyl radical, and DOPAC-levels in striatal microdialysates of Parkinsonian rats[J]. Neurotox Res, 2010, 17: 299-304.
- [8] Westin JE, Janssen MLF, Sager TN, et al. Automated gait analysis in bilateral Parkinsonian rats and the role of 1-DOPA therapy[J]. Behavioural Brain Research, 2012, 226: 519-528.
- [9] Teismann P. Myeloperoxidase in the neurodegenerative process of Parkinson's disease [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2014, 139(3): 99-102.