

# 脂多糖联合 MPTP 诱导的小鼠慢性 帕金森病模型的评价

史肖锦, 屈洪党\*

(蚌埠医学院第一附属医院神经内科, 安徽 蚌埠 233000)

**【摘要】** 目的 建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)联合1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的慢性小鼠帕金森病模型,探讨其行为学和黑质多巴胺能神经元细胞的变化情况。**方法** 将20只C57BL/6小鼠随机分为模型组和对照组,模型组每日腹腔注射LPS(0.25 mg/kg)一次,连续3 d,最后一次注射LPS 4 h后,每日腹腔注射MPTP(25 mg/kg)一次,连续2 d,对照组腹腔注射相同量的生理盐水。8周后用步态分析和转棒实验评价小鼠的行为学能力,免疫组化法观察黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞变化情况。**结果** 模型组小鼠行为学变化较对照组差异有显著性( $P < 0.05$ ),模型组小鼠中脑黑质区显示出严重的神经元细胞损伤。**结论** LPS联合MPTP腹腔注射可成功诱导出慢性小鼠帕金森病模型,提示该模型可用于帕金森病的发病机制及药物治疗效果等相关研究。

**【关键词】** LPS; MPTP; 帕金森病; 小鼠模型; 酪氨酸羟化酶

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0513-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.014

## Evaluation of a mouse model of Parkinson's disease induced by lipopolysaccharide plus MPTP

SHI Xiao-jin, QU Hong-dang

(the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China)

**【Abstract】 Objective** The aim of this study was to establish a mouse model of chronic Parkinson's disease induced by systemic administration of lipopolysaccharide plus 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), and to study the changes of behavioral manifestation, numbers of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. **Methods** Twenty C57BL mice were randomly divided into 2 groups: the saline control group and model group. The mice in the model group received three intraperitoneal (i. p.) injections of LPS (0.25 mg/kg), once daily for three consecutive days. Four hours following the final LPS injection, the mice received one subcutaneous injection of low-dose MPTP (25 mg/kg). The mice of control group were injected with the same volume of saline. Eight weeks later, the motor ability of the mice was evaluated by footprint test and rotarod test. The tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells were observed by immunohistochemical analysis. **Results** Compared with the control group, the scores of behavioral test were significantly lower, numbers of TH immunoreactive cells were significantly less in the Parkinson's model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Behavioral manifestation, number of dopaminergic neurons in the substantia nigra are significantly changed in the mouse models of Parkinson's disease produced by repeated injection of LPS plus MPTP, suggesting that this chronic animal model can be used in the experimental study for pathogenesis and therapy of Parkinson's disease.

**【Key words】** Lipopolysaccharide, LPS; MPTP; Parkinson's disease (PD); Rat model; Tyrosine hydroxylase

[基金项目] 蚌埠医学院研究生创新计划项目(Byycx1406); 教育厅重点项目(KJ2014A163)。

[作者简介] 史肖锦(1988-),女,蚌埠医学院硕士研究生,研究方向:神经病学。Email: 137481290@qq.com

[通讯作者] 屈洪党,男,主任医师,研究方向:神经病学的临床、科研和教学工作。Email: qhd820@souhu.com

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的神经系统退行性疾病,其主要的病理改变为黑质多巴胺能神经元的进行性丢失和残留的神经元胞浆中路易小体形成<sup>[1]</sup>。最近的研究假设 PD 的发病机制可能涉及到多个起因,包括(但不局限于)暴露于环境的神经毒素(如农药、重金属)、遗传学、生活习惯(如农村生活环境)和氧化应激,免疫炎症反应也涉及到 PD 病因学<sup>[2,3]</sup>。且炎症不再被认为仅仅是神经退变过程的一个附带现象,相反它是一个活跃的贡献者<sup>[4]</sup>。目前对 PD 病因和病理生理机制的认知,主要来源于 PD 动物模型,因此模拟出一个能反映 PD 的发病机制、病理学和行为学方面动物模型,是一个有待解决的问题。目前 MPTP 和 6-OHDA 等均是单一因素下诱导的 PD 模型,凋亡的多巴胺神经元可在短时间内自发恢复至正常,且仅仅一个因素并不能必然导致人类慢性多巴胺的耗竭<sup>[5]</sup>。细菌内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导一系列的炎症反应,通过激活迷走神经的传入纤维及中枢神经系统中促炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等,进而激活中枢炎症过程<sup>[6]</sup>。研究表明,LPS 预处理后应用 MPP<sup>+</sup>(MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydro-pyridine 的代谢毒物),结果显示 LPS 预处理组动物模型的纹状体 DA 持续性减少,超过单独应用 MPP<sup>+</sup>组,且持续的时间也较长,表明 LPS 和 MPTP 共同作用可放大神经退行性变的过程<sup>[7]</sup>。本实验通过注射 LPS 诱导系统性炎症后,继续注射低剂量的 MPTP 诱导慢性 PD 模型,观察其行为学和黑质多巴胺神经元细胞的改变情况,证实其更符合 PD 的缓慢进行性发病的过程,可成为研究 PD 的可靠动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 12 周龄的 C57BL/6J 小鼠,20 只,体重 25~27 g,购自扬州大学比较医学中心【SCXK(苏)2012-004】,饲养于蚌埠医学院 SPF 级实验动物中心【SYXK(皖)2012-002】,标准饲养盒内饲养,每盒 5 只。温度控制在 18~22 $^{\circ}$ C,自由饮水和摄食,并保持 12 h/12 h 昼夜循环。

#### 1.1.2 试剂

脂多糖, MPTP, 兔抗酪氨酸羟化酶抗体,生物素

标记的二抗,均购自 Sigma(美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型

20 只 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周,随机分为空白对照组和模型组,每组 10 只。模型组小鼠每日腹腔注射 LPS (0.25 mg/kg) 一次,连续 3 d。最后一天注射 LPS 4 h 后,继续腹腔注射 MPTP (25 mg/kg) 一次,连续 2 d,相当于 LPS 注射 3 次, MPTP 注射 2 次。空白对照组腹腔注射相同体积的生理盐水。

#### 1.2.2 行为学检测

##### (1) 步长分析

自制一个长 1 m、宽 10 cm、高 20 cm 的单向通道,用同样长宽的宣纸铺在通道的底部,训练小鼠穿过通道以测量步长。将小鼠的两后脚掌涂抹墨汁,放于通道的入口,到达另一端出口后其脚印便留在纸上,测量小鼠同侧身体两个脚印的距离,计算出平均步长。通道的开始和结束的步幅长度均不列入计算,因为小鼠在开始行走时会加速步幅不规则,而出口小鼠为了逃离通道步幅会变小。

##### (2) 转棒实验

将小鼠置于直径为 3 cm 的旋转杆上,转速调整为 20 r/min,每次同时测定 5 只小鼠,每个隔室中 1 只。记录小鼠从转棒开始转动至掉离转棒所经历的时间,测定时间为 5 min,共测 5 次取平均值,同一只小鼠检测间隔为 30 min。

##### (3) 游泳实验

将小鼠单独放入一 40 cm  $\times$  25 cm  $\times$  16 cm 的有机玻璃箱中测试器游泳分数,水深为 12 cm,水温为(27  $\pm$  2) $^{\circ}$ C。评分标准如下:3 分,3 min 内连续不断的游泳;2 分,大部分时间游泳偶尔漂浮;1 分,偶尔游泳;0 分,四肢无活动。

#### 1.2.3 免疫组化染色检测小鼠黑质酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的表达

##### (1) 制作中脑黑质石蜡切片

对小鼠进行水合氯醛麻醉,用生理盐水灌流,4%多聚甲醛灌注内固定,剥离出完整的脑组织浸入多聚甲醛中固定 24 h。进行梯度脱水、透明、石蜡包埋,在中脑黑质区连续冠状石蜡切片,选取 5 张切片行 TH 免疫组织化学染色。

##### (2) 免疫组化步骤

烘片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,0.01 mmol/L 3%过氧化氢室温下反应 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次  $\times$  5 min,抗原修复,高火 2 min,使

其快速达到 95℃ 左右,低火维持 12 ~ 14 min,自然冷却至室温,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。5% 羊血清 37℃ 封闭,去掉多余羊血清,加入一抗 4℃ 过夜,37℃ 复温 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。加入生物素标记二抗,37℃ 室温下反应 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色,复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片,拍照。

### 1.3 统计分析方法

采用 SPSS 16.0 进行数据分析,实验数据均采用均数 ± 标准差表示,两组数据采用独立样本 *t* 检验进行比较,以  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠步长分析、转棒实验和游泳实验的比较

8 周末进行的行为学检测,与对照组相比,模型组小鼠平均步长明显减少、在转棒上的时间明显缩短、游泳分值明显下降, $P$  均  $< 0.05$ ,差异具有统计学意义(见表 1)。

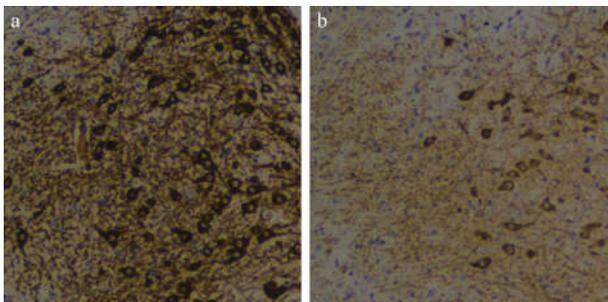
表 1 各组小鼠步长和转棒实验数据结果比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 1 The stride length and rotarod performance in the mice of each group

组别 Groups	步长/cm Stride length	转棒实验 /s Rotarod test	游泳实验/min Swimming
对照组 Control	7.32 ± 0.636	183.10 ± 40.668	2.83 ± 0.408
模型组 Model	5.41 ± 0.299	65.50 ± 21.752	1.50 ± 1.049

### 2.2 黑质酪氨酸羟化酶免疫组化结果

与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠中脑黑质区显示出严重的神经元损伤,多巴胺神经元细胞明显减少,且表现出更多的神经元细胞的萎缩和损坏,细胞体积变小,突起变短,纤维少而稀疏(见图 1)。



注:a;对照组;b;模型组。

图 1 中脑黑质 TH 免疫组织化学检测( $\times 100$ )

Note. a; Control; b; Model

Fig. 1 Representative photomicrographs of TH-immunoreactive neurons in the substantia nigra of mouse brain ( $\times 100$ )

## 3 讨论

PD 是一种与年龄相关的神经退行性疾病,越来越多的研究显示炎症与黑质多巴胺能神经元凋亡的相关性<sup>[8]</sup>。尸检报告显示 PD 患者中脑黑质多巴胺神经元凋亡与小胶质细胞形态学改变和促炎因子的退化均有关<sup>[9]</sup>,但是其具体的机制仍未明确<sup>[10]</sup>。为了更好的研究 PD 的发病机制及相应的治疗策略,模拟出一个能反应 PD 的发病机制、病理学和行为学方面的慢性 PD 动物模型,是一个急需解决的问题。目前的 6-OHDA 和 MPTP 诱导的 PD 模型均为单一定点注射直接损毁小鼠中脑黑质多巴胺,不能很好的模拟 PD 慢性的发病过程。研究表明<sup>[11]</sup>,PD 神经系统进行性退化可能始发于黑质以外的其他神经系统,故利用神经毒素联合注入黑质以外的部位诱导的小鼠帕金森病模型,引起越来越多的人关注。

LPS 是一种内毒素<sup>[12,13]</sup>,对神经元无毒性作用,但它可诱导强大的先天免疫反应,激活小胶质细胞,释放一系列的细胞炎症因子,导致黑质纹状体通路损害和帕金森病行为学症状。MPTP<sup>[14]</sup>为高亲脂性化合物,能有效的通过血脑屏障,主要被小胶质细胞识别,被单胺氧化酶氧化成 MPDP<sup>+</sup>,随后自氧化成毒素 MPP<sup>+</sup>。MPP<sup>+</sup>被 DA 神经元摄取,阻断线粒体复合酶 I 的活性,大幅度增加氧化应激的水平,从而导致纹状体多巴胺水平下降,并逐渐导致中脑黑质致密部多巴胺神经元的死亡。研究表明 LPS 可能会影响血脑屏障,从而影响大脑中 MPTP 的浓度,系统性注射 LPS 可以提高 MPTP 的毒性<sup>[15]</sup>。且 Gao 等<sup>[16]</sup>认为注射 LPS 后继续注射 MPTP 会产生一种协同作用,后 Byler 等<sup>[5]</sup>利用 LPS 联合 MPTP 腹腔注射成功诱导出慢性帕金森病小鼠模型,然而这种模型在国内并未引起广泛关注。

本研究利用 LPS 联合小剂量的 MPTP 作用于 C57BL/6J 小鼠诱导慢性帕金森模型,8 周末行为学检测显示模型组小鼠步长、转棒时间和游泳分值较对照组均下降,TH 免疫组化结果显示模型组中脑黑质 TH 阳性细胞数量较对照组减少,且神经元细胞体积变小,突起变短,纤维少而稀疏。提示 LPS 联合小剂量的 MPTP 腹腔注射可成功诱导出 PD 小鼠模型,且更符合 PD 的缓慢发病过程,说明此种模型可用于帕金森病的病因、病理生理机制及药物治疗效果的研究。

研究表明<sup>[17]</sup>,6-OHDA 和 MPTP 诱导的 PD 小

鼠模型仅导致纹状体多巴胺短时的减少,可很快恢复至正常水平,且缺乏相应的行为学改变,而 LPS 联合 MPTP 小鼠模型步长缩短及黑质纹状体多巴胺减少至少可持续 4 个月。本研究结果与这一观点相符合,LPS 联合 MPTP 小鼠模型步长缩短及黑质多巴胺神经元损伤较严重,持续时间较长,且该模型未出现小鼠死亡或者诱导运动功能减退失败的情况。步长缩短是帕金森病患者身上的主要特征<sup>[18,19]</sup>,故利用步长测定进行行为学检测,更能反应帕金森小鼠模型的行为学改变情况。

总之,LPS 联合 MPTP 腹腔注射可成功诱导出帕金森病小鼠模型,该模型可用于 PD 的发病机制和病理生理变化的研究,也可为研究药物的治疗效果提供合适的动物模型。以后可以对小胶质细胞增生、促炎因子的表达以及突触核蛋白的聚集的情况做出进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Lazzarini M, Martin S, Mitkovski M, et al. Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model [J]. *Glia*, 2013, 61: 1084 - 1100.
- [ 2 ] 孟凛冽,李峰,伞勇智,等. 帕金森病氧化应激机制及抗氧化药物治疗进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2015(2): 380 - 383.
- [ 3 ] 王茜,张辉,刘名,等. 小白菊内酯对帕金森病小鼠模型黑质多巴胺能神经元的保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(3): 357 - 362.
- [ 4 ] 王玲.  $\alpha$ -synuclein 诱导的神经炎症在帕金森病发生中的作用 [D]. 南京医科大学, 2013.
- [ 5 ] Byler SL, Boehm GW, Karp JD, et al. Systemic lipopolysaccharide plus MPTP as a model of dopamine loss and gait instability in C57Bl/6J mice [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 198(2): 434 - 439.
- [ 6 ] 杨绍松,陶凯,逯芳芳,等. iNOS 在 LPS 诱导活化小胶质细胞中的表达变化 [J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(6): 666 - 670.
- [ 7 ] Goralski KB, Renton KW. Brain inflammation enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium-evoked neurotoxicity in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 196:381 - 389.
- [ 8 ] Anitua E, Pascual C, Pérez-Gonzalez R, et al. Intranasal PRGF-Endoret enhances neuronal survival and attenuates NF- $\kappa$ B-dependent inflammation process in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Controlled Release*, 2015, 203: 170 - 180.
- [ 9 ] 王岚,沈伟. 美满霉素对脂多糖诱导的 BV-2 小胶质细胞肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的影响 [J]. *临床神经病学杂志*, 2014, 27(4): 286 - 288.
- [ 10 ] Hu Y, Yu SY, Zuo LJ, et al. Parkinson disease with REM sleep behavior disorder features,  $\alpha$ -synuclein, and inflammation [J]. *Neurology*, 2015, 84(9): 888 - 894.
- [ 11 ] Del Tredici K, Jost WH. [Gastrointestinal dysfunction in idiopathic Parkinson's disease] [J]. *Der Nervenarzt*, 2012, 83(10): 1282 - 1291.
- [ 12 ] Gao H M, Zhang F, Zhou H, et al. Neuroinflammation and  $\alpha$ -synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Environ Health Persp*, 2011, 119(6): 807.
- [ 13 ] 郭玉霞,杨波,石磊,等. 姜黄素对中脑定位注射脂多糖引起帕金森样病变小鼠的抗炎机制研究 [J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(6): 582 - 587.
- [ 14 ] 陈浩,师亮,王燕宏,等. 甘草黄酮对 MPTP 帕金森病小鼠的实验性治疗研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 12: 1112 - 1113.
- [ 15 ] Lecca D, Nevin DK, Mulas G, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory properties of a novel non-thiazolidinedione PPAR $\gamma$  agonist in vitro and in MPTP-treated mice [J]. *Neuroscience*, 2015,302:23 - 35.
- [ 16 ] Gao HM, Liu B, Zhang W, et al. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease [J]. *FASEB J*, 2003, 17(13): 1957 - 1959.
- [ 17 ] Tillerson JL, Caudle WM, Reverón ME, et al. Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine [J]. *Exp Neurol*, 2002, 178(1): 80 - 90.
- [ 18 ] 文龙,钱晋武,沈林勇,等. 帕金森病患者步态测量与定量分析 [J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29(7): 637 - 641.
- [ 19 ] 李利,刘晶,罗蔚锋,等. 帕金森病冻结步态研究进展 [J]. *中华神经科杂志*, 2014, 47(8): 565 - 567.

[收稿日期] 2015-05-20