

苍白球 P 物质对帕金森病僵直模型大鼠的影响

郑长民 薛雁 陈蕾

【摘要】 目的 观察苍白球 P 物质对氟哌啶醇帕金森病僵直模型大鼠的影响。方法 行为学实验采用大鼠腹腔注射氟哌啶醇诱发帕金森病僵直模型,苍白球分别微量注射生理盐水、NK-1 受体激动剂 SMSP、NK-1 受体阻断剂 SR140333B、SR140333B 和 SMSP 的混合物,观察其对大鼠爬杆行为的影响。电生理学实验利用细胞外微压力注射上述药物,观察对苍白球神经元放电的影响。**结果** 大鼠腹腔注射氟哌啶醇可立刻产生僵直症状,平均僵直潜伏期最大值出现在第 30 分钟,为(259.8 ± 34.8)s。最小值出现在第 50 分钟,为(145.2 ± 54.8)s。双侧苍白球微量注射 SMSP 可明显改善僵直症状,第 10 分钟平均僵直潜伏期为(10.4 ± 3.4)s,第 60 分钟为(58.4 ± 38.8)s,差异有统计学意义($P < 0.01$)。双侧苍白球同时注入 SR140333B 和 SMSP 混合物可明显阻断 SMSP 的抗僵直症状,第 10 分钟为(176.4 ± 64.4)s,第 60 分钟为(139.2 ± 59.7)s,与单纯注射 SMSP 相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。进一步细胞外电生理记录结果显示 SMSP 可使氟哌啶醇大鼠苍白球神经元放电频率由(13.4 ± 4.2)Hz 增加至(17.5 ± 5.6)Hz,平均升高(29.4 ± 8.6)% ($P < 0.05$, $n = 13$),该效应可被 SR140333B 完全阻断(SR140333B;(10.3 ± 2.5)Hz, SR140333B + SMSP;(11.3 ± 3.0)Hz, $P > 0.05$, $n = 8$)。**结论** 苍白球 P 物质通过增加神经元放电,改善氟哌啶醇所致的神经元兴奋性降低,从而解除基底神经节对丘脑及大脑皮层的抑制效应,提示其可能起抗帕金森病的作用。

【关键词】 苍白球; P 物质; 氟哌啶醇; 帕金森病

Effects of substance P in globus pallidus on haloperidol-induced Parkinsonian model rats ZHENG Chang-min, XUE Yan, CHEN Lei. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China

【Abstract】 To investigate the effects of substance P in globus pallidus on haloperidol-induced Parkinson's disease model rat. **Methods** In behavioral experiments, guide cannulae constructed from stainless steel were implanted into the globus pallidus. After five days recovery, 0.5 μl drugs (normal saline, SMSP, SR140333B, SR140333B + SMSP) were bilaterally microinjected into the globus pallidus in awake rats with haloperidol administration intraperitoneally. The catalepsy was then observed within 60 min. In electrophysiological study, an in vivo extracellular recording was performed to observe the effects of substance P on the firing rate of pallidal neurons. **Results** Haloperidol induced catalepsy in rats with intrapallidal saline microinjection. The maximum average latency was (259.8 ± 34.8)s at the time point of 30th min. The minimum average latency was (145.2 ± 54.8)s at 50th min. Bilateral microinjection of SMSP into globus pallidus significantly attenuated haloperidol-induced catalepsy (The average latency was (10.4 ± 3.4)s at 10th min and (58.4 ± 38.8)s at 60th min, $P < 0.01$). This anticataleptic effect was completely counteracted by selective NK-1 receptors antagonist SR140333B (The average latency was (176.4 ± 64.4)s at 10th min and (139.2 ± 59.7)s at 60th min, $P < 0.01$). Furthermore, micropressure ejection of SMSP significantly increased the firing rate of pallidal neurons (Basal: (13.4 ± 4.2)Hz, SMSP: (17.5 ± 5.6)Hz). The average increase was (29.4 ± 8.6)% ($P < 0.05$, $n = 13$). SR140333B completely blocked SMSP-induced increase in firing rate (SR140333B: (10.3 ± 2.5)Hz, SR140333B + SMSP: (11.3 ± 3.0)Hz, $P > 0.05$, $n = 8$). **Conclusion** Based on the action of substance P in globus pallidus of parkinsonian rats, it is hypothesized that activation of substance P receptor in globus pallidus may play a role in the treatment of Parkinson's disease.

【Key words】 Globus pallidus; Substance P; Haloperidol; Parkinson's disease

有研究表明,黑质多巴胺能神经元退化性变可通过间接通路降低苍白球兴奋性,从而导致帕金森病运动减少症状^[1]。近年来有研究表明,帕金森病患者及动物模型苍白球出现异常的簇状放电与帕金森病静止性震颤症状直接相关^[2]。P 物质作为脑内重要的神经

递质或神经调质参与包括帕金森病在内的多种中枢神经系统疾病的发病,电生理学研究揭示 P 物质可兴奋黑质多巴胺能神经元。P 物质可促进纹状体末梢多巴胺的释放,纹状体注射 P 物质可改善帕金森病模型动物的运动功能并减轻其僵直症状。由此可见,P 物质与帕金森病发病密切相关。形态学研究揭示苍白球表达 P 物质及其受体^[3],帕金森病可明显改变苍白球 P 物质及其受体的表达。有报道帕金森病人苍白球 P 物质的表达降低,而另有报道 6-羟多巴胺帕金森病模型大鼠苍白球 P 物质表达明显升高^[4]。此外,帕金森病可降低苍白球 P 物质受体的表达^[5]。本研究采用

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2010.04.001

基金项目:国家自然科学基金(30870800);青岛市科技局课题(08-2-1-2-nsh)

作者单位:266071 青岛,青岛大学医学院生理学教研室

通信作者:陈蕾,Email:chenleiqd@163.com

行为学及电生理学方法探讨苍白球 P 物质对氟哌啶醇制备的帕金森病僵直大鼠的影响。

材料与方法

一、材料

1. 动物:实验选用健康成年雄性 Wistar 大鼠, 体重 230 ~ 260 g, 由青岛市药检所提供。大鼠在室温 (22 ± 1) °C、保持 12 h 白天 12 h 黑夜循环的环境下饲养, 自由饮水和进食。

大鼠 26 只, 行为学及电生理学实验分别分成以下 4 组: ①对照组: 苍白球内给予无菌生理盐水; ②SMSP 组: 苍白球内给予 NK-1 受体激动剂 SMSP (0.1 mM); ③SR140333B 组: 苍白球内注射特异性 NK-1 受体阻断剂 SR140333B (0.5 mM); ④SR140333B + SMSP 组: 苍白球内给予 SR140333B 和 SMSP 的混合物。观察苍白球给予上述药物对大鼠僵直行为及苍白球神经元放电的影响。

2. 试剂及来源: SMSP 购自 Tocris 公司 (英国)。SR140333B 由 Sanofi-Aventis-Chilly-Mazarin 公司免费提供。氟哌啶醇购自 Sigma 公司 (美国), 水合氯醛购自上海化学试剂公司。

二、方法

1. 苍白球埋置套管: 手术当天, 腹腔注射水合氯醛 (400 mg/kg) 麻醉, 大鼠俯卧位固定在立体定位仪上 (Narishige, 日本), 头部正中切口, 剥离骨膜, 使前后囟位于同一水平面。参照大鼠脑图谱, 在颅骨表面钻孔, 清除脑膜, 将内径 0.3 mm, 外径 0.4 mm 的自制不锈钢套管垂直置于双侧苍白球^[6] (坐标为: 前囟后 1.0 mm, 正中线上旁开 3.0 mm, 颅骨表面下 6.8 mm), 将一小螺丝钉固定于颅骨表面, 用 502 胶和自凝牙托粉固定套管, 并置入不锈钢内芯以封闭套管。手术后常规腹腔注射青霉素 10 万单位, 连续注射 3 d, 以防术后感染。

2. 僵直实验测试^[7]: 大鼠经过上述手术双侧埋置套管, 术后至少恢复 5 d, 进行僵直实验测试。为减轻昼夜节律对大鼠的影响, 本僵直实验选在 12:00 ~ 17:00 之间进行。测试前, 将实验动物置于实验室至少 30 min, 以令其适应实验环境。大鼠腹腔注射氟哌啶醇 (0.25 mg/kg), 制备帕金森病僵直大鼠模型, 60 min 后分别进行苍白球内微量注射。拔出内芯后, 将与微量注射器相连的注射针插入套管。注射针头超出外套管边缘 3.4 mm。无菌生理盐水、SMSP、SR140333B、SR140333B + SMSP 通过注射针缓慢均匀的注射到苍白球, 苍白球内注射剂量为每侧 0.5 μl, 1 min 内注射完毕, 注射完毕后留针 1 min。

僵直程度用大鼠爬杆实验进行评价。爬杆实验即用一根距离实验台高 9 cm、水平放置的圆柱状金属杆, 将大鼠双前肢轻置于金属杆上, 记录大鼠两前肢在金属杆上保持静止不动的时间 (僵直潜伏期), 当大鼠的前肢在金属杆上移动或爬下或出现头部转动即停止计

时, 最长的僵直潜伏期定为 300 s。爬杆实验每 10 min 记录 1 次, 共记录 60 min。实验前 3 d, 每天按上述操作步骤对大鼠进行训练 3 次, 以减小动物因对操作的不适应产生的影响。

3. 电生理学方法: (1) 麻醉: 用 20% 乌拉坦 (1 g/kg) 进行腹腔注射麻醉。实验中根据大鼠麻醉情况酌情补充, 每次补充 0.2 ml, 使动物保持麻醉状态。维持大鼠体温在 (37 ± 1) °C。(2) 颅骨开窗术: 大鼠取俯卧位, 用耳杆固定于脑立体定位仪上, 保持耳间线高于门齿杆 3.0 mm, 头部正中切口, 剥离骨膜。用牙科钻在颅骨表面苍白球区域钻孔, 清除脑膜, 用生理盐水充分止血, 覆盖 2% 琼脂生理盐水与颅骨表面齐平, 以保护大脑皮层以及作为颅骨表面定位的标志。参照 Paxinos 和 Watson 大鼠脑图谱, 定位苍白球坐标: 前囟后 0.8 ~ 1.2 mm, 旁开 2.5 ~ 3.5 mm, 深度 5.5 ~ 7.2 mm。(3) 电极制备: 将 3 根玻璃微电极两端用直径 0.19 mm 的铜丝绑牢, 固定在微电极拉制仪上, 采用两步拉制法调节参数, 温度 96 °C, 拉力 84 牛顿, 拉制 3 管玻璃微电极。电极尖端在显微镜下观察直径 3 ~ 10 μm。电极阻抗 10 ~ 20 MΩ。记录电极管内注入 2% 溴胺天蓝, 其余 2 管与四道压力注射仪相连接用于注射药物。(4) 细胞外放电记录, 压力注射给药: 根据监听器监测的声音变化, 以及监视器显示基线突然变细的现象, 判断电极尖端进入空气与琼脂界面。用液压推进器将微电极尖端缓慢送至苍白球。根据核团位置和苍白球神经元的电生理学特性寻找鉴别苍白球神经元。药物注射前至少观察细胞放电 5 min, 待细胞放电平稳后, 药物通过气体压力 (1500 ms, 5.0 ~ 15.0 psi) 注射到神经元表面。放电信号经 MEZ-8201 型放大器放大后输入到 VC-11 型双道示波器显示波形, 电信号经由示波器同步 Y 轴输出, 通过 SMUP-PC 型生物电信号处理系统输入计算机, 由 Histo 软件进行放电频率分析。加药前 120 s 内平均每秒放电频率作为对照, 加药后反应高峰 50 s 内平均每秒放电频率作为药物的效应。加压注射药物后, 神经元反应高峰平均每秒放电频率与加药前对照组相比增加或者降低超过 20% 认为有统计学意义。

4. 组织学检查: 电生理学实验结束后, 微电极接阴极, 参考电极接阳极, 利用离子电渗方法 (10 μA, 20 min), 将电极内的溴胺天蓝电泳入脑组织, 标记电极尖端所在的位置。所有电生理学和行为学实验后的大鼠, 以 8% 水合氯醛 (500 mg/kg) 腹腔注射深麻醉, 经左心室相继灌注生理盐水 200 ml、4% 多聚甲醛 200 ml。大脑取出后冷冻 30 min, 用冰冻切片机将大脑切成 20 μm 厚的脑片, 在显微镜下观察注射点和针道的位置。只有注射点位置正确的大鼠, 其数据才被用于统计学分析。

5. 统计学处理: 电生理学实验所得数据均以均数 ± 标准误表示。配对 t 检验用于比较同一神经元加药前

和加药后放电频率有无统计学意义,非配对 t 检验和单因素 ANOVA 检验用于比较两组或者多组实验数据。大鼠行为学实验采用非参数 ANOVA (Kruskal-Wallis) 检验及 Mann-Whitney U 检验。

结 果

一、SMSP 对氟哌啶醇帕金森病模型大鼠僵直症状的影响

腹腔注射氟哌啶醇导致大鼠产生的僵直及运动减少等症状被认为是一种可靠的帕金森病症状模型^[7]。单纯给予大鼠腹腔注射相应剂量的氟哌啶醇溶剂 DMSO 不能引起任何僵直及运动减少症状,苍白球内注射 0.5 μ l 生理盐水对大鼠运动行为无明显影响,大鼠均在 3 s 内爬下金属杆。

1. 苍白球注射 SMSP 产生的抗僵直作用:大鼠腹腔注射氟哌啶醇(0.25 mg/kg)能产生相对稳定的僵直状态,呈现肌肉僵直,运动减少等症状。在对照组中($n=4$),注射氟哌啶醇 60 min 后给予大鼠双侧苍白球微量注射无菌生理盐水(0.5 μ l/侧),在接下来的 60 min 观察时间里,平均僵直潜伏期最大值出现在第 30 分钟,为(259.8 \pm 34.8) s,最小值出现在第 50 分钟,为(145.2 \pm 54.8) s。在 SMSP 组中,双侧苍白球微量注射 0.1 mM SMSP(0.5 μ l/侧, $n=5$)能够显著缓解氟哌啶醇导致的僵直症状($P < 0.01$),SMSP 的抗僵直作用于苍白球内注射后立即出现,第 10 分钟平均僵直潜伏期为(10.4 \pm 3.4) s,在注射后 1 h 末的平均僵直潜伏期为(58.4 \pm 38.8) s。见图 1。

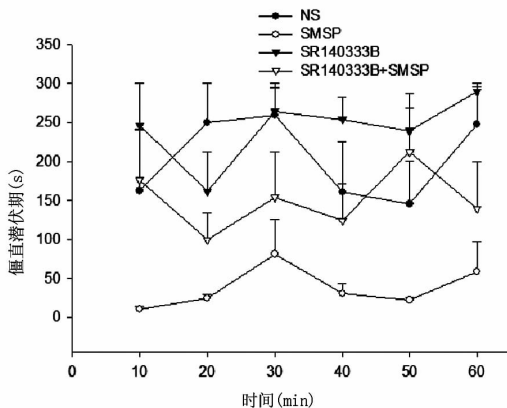


图 1 苍白球 P 物质对氟哌啶醇所致帕金森病模型大鼠僵直症状的影响

2. 选择性 NK-1 受体阻断剂对 SMSP 抗僵直作用的影响:双侧苍白球内单独注射 SB140333B(0.5 mM, $n=5$),平均僵直潜伏期最大值出现在第 60 分钟,为(290.0 \pm 6.3) s,最小值出现在第 20 分钟,为(162.0 \pm 49.9) s,与生理盐水对照组相比,无显著差异($P > 0.05$)。在另一组大鼠,双侧苍白球微量注射 SB140333B 和 SMSP 的混合物($n=5$)能够显著减弱 SMSP 的抗僵直作用。在 60 min 的观察时间里,联合

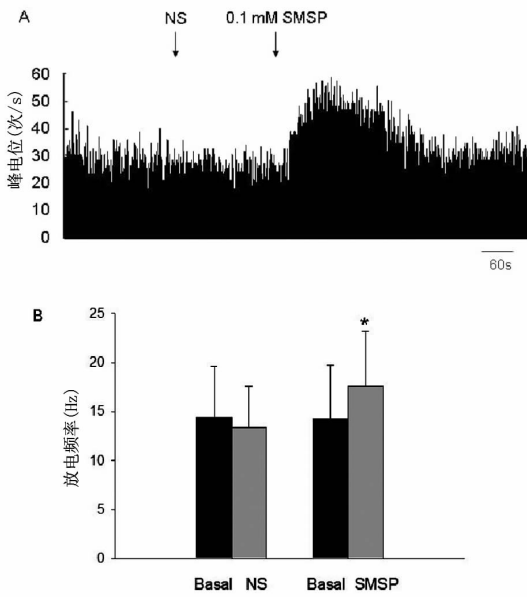
给予 SB140333B 和 SMSP 混合物大鼠的平均僵直潜伏期较单独 SMSP 相比明显延长,在第 10 分钟为(176.4 \pm 64.4) s,峰值出现在第 50 分钟为(212.4 \pm 56.2) s,在第 60 分钟为(139.2 \pm 59.7) s,平均僵直潜伏期与单独 SMSP 组相比有显著统计学意义($P < 0.01$),与生理盐水对照组相比无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

二、SMSP 对腹腔注射氟哌啶醇大鼠苍白球神经元放电频率的影响

在腹腔注射氟哌啶醇的条件下,苍白球内微量加压注射 SMSP 可以明显增加苍白球神经元的放电频率。在记录到的 13 个苍白球神经元中,0.1 mM SMSP 可以使放电频率由(13.4 \pm 4.2) Hz 升高至(17.5 \pm 5.6) Hz ($P < 0.05$),放电频率平均升高(29.4 \pm 8.6)%。其中放电频率升高超过 20% 的神经元有 7 个,反应率为 53.8%,放电频率由(16.6 \pm 7.6) Hz 升至(23.7 \pm 9.8) Hz,平均升高(50.3 \pm 9.9)%。在对照组($n=10$)中,苍白球内微量加压注射无菌生理盐水使神经元放电频率由(14.4 \pm 5.2) Hz 变化至(14.3 \pm 5.5) Hz ($P > 0.05$),平均降低(4.8 \pm 3.9)%。SMSP 组与无菌生理盐水对照组相比能够显著增加苍白球神经元放电频率,差别具有显著统计学意义($P < 0.05$)。上述实验结果提示 SMSP 能够提高苍白球神经元的兴奋性。进一步电生理实验结果显示,特异性 NK-1 受体阻断剂 SR140333B(0.5 mM)可完全阻断 SMSP 的兴奋效应[SR140333B(10.3 \pm 2.5) Hz, SR140333B + SMSP(11.3 \pm 3.0) Hz, $P > 0.05$, $n=8$],而 SR140333B 本身对苍白球神经元放电频率没有明显影响[加药前(12.3 \pm 3.9) Hz,加药后(13.0 \pm 4.3) Hz ($P > 0.05$)],见图 3。

讨 论

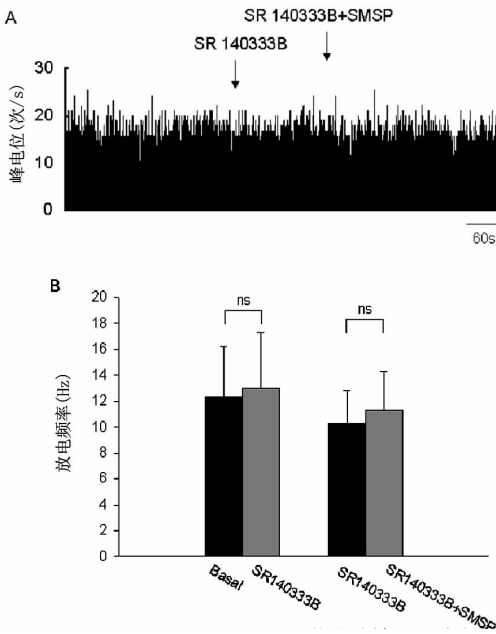
基底神经节内存在两条调节运动行为的通路,即直接通路和间接通路。直接通路起源于纹状体内一群受多巴胺 D1 受体调节的 GABA 能神经元,而间接通路起源于纹状体内另一群受多巴胺 D2 受体调节的 GABA 能神经元。多巴胺 D2 受体阻断剂氟哌啶醇能够阻断纹状体内的多巴胺 D2 受体,增强纹状体-苍白球通路功能活动,导致苍白球神经元兴奋性降低,从而增强基底神经节对丘脑和大脑皮层等运动传出区域的抑制效应,致使动物呈现帕金森病运动功能降低,活动减少,僵直等表现。氟哌啶醇模型被认为是一种可靠的帕金森病僵直症状模型。本实验利用爬杆实验证实,苍白球微量注射 P 物质受体激动剂 SMSP 可明显改善氟哌啶醇帕金森病模型大鼠的僵直行为,该效应可被特异性 P 物质受体阻断剂阻断。该行为学实验结果提示苍白球 P 物质通过激活 NK-1 受体提高苍白球神经元兴奋性,减轻氟哌啶醇对苍白球神经元兴奋性的抑制作用。苍白球通过其抑制性传出冲动抑制丘脑底核的兴奋性,由丘脑底核发出的兴奋性冲动减少,



A: 频率直方图显示 SMSP 增加放电;

B: 柱状图显示 SMSP 和生理盐水处理组放电频率的变化

图 2 SMSP 增加氟哌啶醇所致帕金森病模型大鼠苍白球神经元放电频率



A: 频率直方图显示 SR140333B 对 SMSP 效应的影响;

B: 柱状图显示 SR140333B 组和 SR140333B + SMSP 组放电频率和变化

图 3 SR140333B 阻断 SMSP 对苍白球神经元放电频率的兴奋效应

基底神经节输出核团(黑质网状带和脚间核)的兴奋性降低,从而可解除基底神经节对丘脑及大脑皮层等运动传出区域的抑制效应,同侧运动传出增强,致使动物僵直行为改善。为了验证对上述行为学结果的推论,并揭示 P 物质抗僵直作用的电生理学机制,我们进一步观察了 SMSP 对腹腔注射氟哌啶醇大鼠苍白球神经元放电频率的影响。首先,腹腔注射氟哌啶醇能够显著降低苍白球神经元兴奋性。在腹腔注射氟哌啶醇模拟帕金森病僵直症状的大鼠中,苍白球内微量加

压注射 SMSP 能明显增加苍白球神经元放电,说明 SMSP 具有兴奋苍白球神经元的作用。

有研究表明脑内 P 物质参与帕金森病发病。首先,基底神经节表达高水平的 P 物质及其受体;其次, P 物质不仅能兴奋黑质多巴胺能神经元,而且可以提高帕金森病状态下纹状体多巴胺水平^[8]。此外,帕金森病时苍白球 P 物质的表达升高但 P 物质受体的表达降低。早期研究表明,在部分黑质纹状体 6-羟多巴胺损毁的帕金森病模型动物,脑内给予 P 物质或其活性片段可促进其运动功能的恢复。然而, P 物质抗帕金森病的机制尚不十分清楚。大量形态学实验证实苍白球接受来自纹状体的 P 物质能纤维支配。大鼠及人苍白球表达 NK-1 受体,该受体分布于苍白球神经元细胞膜以及形成对称性和非对称性突触的突触前末梢。众所周知,苍白球参与正常及运动障碍性疾病状态下机体运动功能的调节。黑质多巴胺神经元退行性变可降低苍白球神经元电活动,从而出现帕金森病僵直症状。本实验行为学及电生理学研究结果显示 P 物质可兴奋苍白球神经元,提示纹状体苍白球 P 物质系统可能是脑内 P 物质系统抗帕金森病作用的途径之一。与本研究结果相一致,帕金森病造成的纹状体苍白球 P 物质系统的高表达可能反映了机体的代偿机制。然而,形态学和电生理学研究提示基底神经节其他核团也表达 P 物质及其受体。因而, P 物质抗帕金森病的作用可能依赖其对所有基底神经节核团的共同作用。

综上所述,在氟哌啶醇所致的帕金森病僵直模型大鼠, P 物质可能通过兴奋苍白球神经元改善大鼠僵直行为。这可能为 P 物质抗帕金森病的作用机制提供有效的实验依据。

参 考 文 献

- [1] DeLong M, Wichmann T. Update on models of basal ganglia function and dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009, 15(Suppl 3): S237-240.
- [2] Raz A, Vaadia E, Bergman H. Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine vervet model of parkinsonism. *J Neurosci*, 2000, 20: 8559-8571.
- [3] Mounir S, Parent A. The expression of neurokinin-1 receptor at striatal and pallidal levels in normal human brain. *Neurosci Res*, 2002, 44: 71-81.
- [4] Martorana A, Fusco FR, D' Angelo V, et al. Enkephalin, neurotensin, and substance P immunoreactive neurons of the rat GP following 6-hydroxydopamine lesion of the substantia nigra. *Exp Neurol*, 2003, 183: 311-319.
- [5] Fernandez A, de Ceballos ML, Jenner P, et al. Neurotensin, substance P, delta and mu opioid receptors are decreased in basal ganglia of Parkinson's disease patients. *Neuroscience*, 1994, 61: 73-79.
- [6] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego Academic Press, 1998.
- [7] Schmidt WJ, Mayerhofer A, Meyer A, et al. Ecstasy counteracts catalepsy in rats, an anti-parkinsonian effect? *Neurosci Lett*, 2002, 330: 251-254.
- [8] Krasnova IN, Bychkov ER, Lioudny VI, et al. Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience*, 2000, 95: 113-117.

(收稿日期: 2009-11-04)

(本文编辑: 冯学泉)