|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分类号： |  | 密级： |
| U D C ： |  | 编号： |

**学 位 论 文**

**MPTP 损伤对食蟹猴嗅球神经递质表达的影响**

**The impact on neurotransmitters of olfactory bulb in cynomolgus monkeys damaged by MPTP**

**程炜**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 指 导 教 师 姓 名 | 李光武 副教授 安徽医科大学基础医学院 | | |
| 任振华 副教授 安徽医科大学基础医学院 | | | |
| 申 请 学 位 级 别 | 硕士 | 专 业 名 称 | 神经生物学 |
| 提 交 论 文 日 期 | 2014.3.10 | 论 文 答 辩 日 期 | 2014.5.18 |
| 学位授予单位和日期 | 安 徽 医 科 大 学 | |  |
|  |  | 答 辩 委 员 会 主 席 | 申国明教授 |
|  |  | 评 阅 人 | 高隽 教授 |

2014 年 5 月

安徽医科大学

Anhui Medical University

**硕士学位论文**

论文题目

**MPTP 损伤对食蟹猴嗅球神经递质表达的影响**

**The impact on neurotransmitters of olfactory bulb in cynomolgus monkeys damaged by MPTP**

**作者姓名：程炜**

**指导老师：李光武** **任振华学科专业：神经生物学**

**研究方向：神经解剖** **神经化学**

**论文工作时间：2012年10月至2014年3 月**

学位论文独创性声明

本人所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 日 期：

学位论文使用授权声明

本人完全了解安徽医科大学有关保留、使用学位论文的规定：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。愿意将本人的学位论文提交《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》和《中国学位论文全文数据库》中全文发表，并可以以电子、网络及其他数字媒体形式公开出版，并同意编入CNKI《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名：导师签名：

日期：日期：

目 录

[英文缩略词 表](#_Toc686530917) 4

[摘 要](#_Toc686530918) 5

[Abstract](#_Toc686530919) 6

[前](#_Toc686530920)[言](#_Toc686530920) 7

[第一部分 食蟹猴MPTP帕金森病系统性模型的建立](#_Toc686530921) 7

[第二部分 MPTP损伤对食蟹猴嗅球中神经递质表达的影响](#_Toc686530922) 8

[第三部分 MPTP损伤对食蟹猴嗅球胶质细胞的影响](#_Toc686530923) 13

[第四部分 MPTP损伤对细胞凋亡的影响](#_Toc686530924) 15

[第三部分 附图](#_Toc686530925) 16

[第四部分 附图](#_Toc686530926) 17

[讨论](#_Toc686530927) 19

[结论：](#_Toc686530928) 20

[创新点](#_Toc686530929) 20

[进一步研究方向](#_Toc686530930) 20

[参考文献](#_Toc686530931) 20

[附 录](#_Toc686530932) 22

[综述](#_Toc686530933) 22

[前 言](#_Toc686530934) 22

[参考文献：](#_Toc686530935) 23

# 英文缩略词 表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英 文 缩 写** | **英** 文 名 称 | **中 文 名 称** |
| MPTP | 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine | 1- 甲 基 -4- 苯 基  -1,2,3,6-四氢吡啶 |
| DA | Dopamine | 多巴胺 |
| DARPP32 | dopamine and adenosine 3 ´ 5 ´  -monophosphate-regulated phosphophate | 多巴胺和 cAMP 调节的磷蛋白 |
| DAT | Dopamine transporter | 多巴胺转运体 |
| GABA | γ－aminobutyric acid | γ-氨基丁酸 |
| 5-HT | 5-hydroxytryptamine | 五羟色胺 |
| ChAT | Choline acetyltransferase | 乙酰胆碱转移酶 |
| Ibal | Ionized calcium binding adaptor protein | 离子化钙结合调节蛋白 |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein | 胶质细胞原纤维酸性蛋白 |
| TNF-α | Tumor necrosis factor-α | 肿瘤坏死因子-α |
| GL | Glomerular layer | 突触小球层 |
| IPL | Internal plexiform layer | 内网状层 |
| CRH | External plexiform layer | 外网状层 |

MPTP损伤对食蟹猴嗅球神经递质表达的影响

摘 要

研究目的

不同于传统的限于运动系统认知，帕金森病更可以视为是以嗅觉障碍为主要症状而以运动障碍为次要症状的疾病。作为嗅觉通路中重要枢纽的嗅球在该疾病中的病理改变亦被广泛研究。MPTP非人灵长类帕金森病模型是迄今最理想的研究帕金森病发病机制的动物模型。

本研究旨在通过免疫组化的方法观察食蟹猴嗅球神经解剖和神经化学的特征，包括：1。食蟹猴嗅球组织结构学特点；2.食蟹猴嗅球各主要神经递质的表达情况，胶质细胞的分布；3. MPTP损伤对食蟹猴嗅球神经递质表达，胶质细胞和细胞凋亡的影响，MPTP损伤对食蟹猴嗅球中各主要神经递质表达、凋亡信号、胶质细胞的影响，这些知识可以给研究帕金森病嗅觉障碍积累一定的背景知识。

第一部分MPTP食蟹猴帕金森病模型的建立方法

成年健康食蟹猴6只，在动物中心严格按照AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, 国际实验动物评估和认可管理委员会)规定和要求对动物进行日常的饲养、关怀和管理。采用小剂量连续给药方法，即0.2mg/kg MPTP-HCl溶液，于下肢静脉缓慢注入，每天早晨1次（9AM）。采用个体化原则，以出现典型的临床症状为注射终点。

结果

注射MPTP后10～14（12.0±1.67）天，临床评分达到10(10.5±0.55)分，此时所有实验猴均逐渐出现典型的运动损害症状，包括运动迟缓、随意运动活动减少、屈曲体态、姿势步态不稳，肌强直、间断性僵直发作及姿势性或静止性震颤。在其后约1周的时间（开始注射MPTP后18.8±2.9天）临床症状持续进展并进

入相对稳定期，此时临床评分为（19.5±4.8）分。第二部分MPTP损伤对食蟹猴嗅球神经递质表达的影响方法

摘取模型组和对照组食蟹猴嗅球后制成石蜡切片。我们首先选择的抗体针对的抗原物质为单胺类神经递质DA、5-HT。两种抗体分别染模型组和对照组各25张石蜡切片，再从25张食蟹猴嗅球石蜡切片中随机选取5张，选取视野，显微镜摄片，分析免疫组化图片，测平均光密度，计阳性细胞数。

我们也选择了氨基酸类神经递质GABA和ChAT，研究方法同上。多巴胺系统与帕金森病颇具关联，这里我们除了研究DA，还研究多巴胺通路上的信号分子受体和转运体蛋白，分别为DARPP32 D1R D2R DAT。

结果

与对照组比较，MPTP组的单胺类神经递质DA和5-HT的阳性细胞数和阳性纤维量均减少。

与对照组比较，MPTP组氨基酸类神经递质GABA的阳性细胞数和阳性细胞量均减少。

与对照组比较，MPTP组ChAT阳性细胞数与阳性纤维量均减少。

与对照组比较，MPTP组DARPP32 D1R D2R DAT阳性细胞数与阳性纤维量均减少，其中以DAT减少程度尤为显著。

第三部分MPTP损伤对食蟹猴嗅球胶质细胞的影响方法

以抗Iba1抗体、抗GFAP抗体、抗TNF-α抗体用SABC法染色，每组从25张食蟹猴嗅球石蜡切片中随机选取5张，显微镜摄片，分析免疫组化图片，测平均光密度，计阳性细胞数。从而观察MPTP损伤对食蟹猴嗅球胶质细胞的影响。

结果

与对照组比较，MPTP组Iba1阳性物质增多，提示小胶质细胞有增殖。与对照组比较，MPTP组GFAP阳性物质增多，提示星形胶质细胞有增殖。

与对照组比较，MPTP组TNF-α阳性物质增多，提示有炎性反应。第四部分MPTP损伤对食蟹猴嗅球细胞凋亡的影响

方法

用抗Bcl2和抗caspase3抗体以SABC法染色，每组从25张食蟹猴嗅球石蜡切片中随机选取5张，选取视野后显微镜摄片，分析免疫组化图片，测平均光密度，计阳性细胞数。观察MPTP损伤对食蟹猴嗅球凋亡信号的影响。

结果

与对照组比较，MPTP组Bcl2阳性物质减少，caspase3阳性物质增多，提示

细胞凋亡异常，呈上升。结论

食蟹猴嗅球的组织结构是环状的多层结构。

MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球神经递质表达的减少。

MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球胶质细胞的增生和炎症反应，免疫反应。

关键词：MPTP 食蟹猴； 嗅球； 免疫组化； 神经递质； 凋亡信号分子； 胶质细胞

**The impact on neurotransmitters of olfactory bulb in cynomolgus monkeys damaged by MPTP**

Abstract

Not confined to the traditional conception of PD, it may well have been classified as a primary olfactory disorder with secondary motor accompaniments. As a hinge of olfactory pathway, the pathology of the olfactory bulb has been widely researched. MPTP-induced parkinsonism cynomolgus monkey model has been viewed as the most ideal model for the research of parkinsonism. The study aims to open out the neuroanatomical and neurochemical characteristics of cynomolgus monkey olfactory bulb via immunohistochemical methods. These characteristics include: 1. the celluar architecture of cynomolgus monkey olfactory bulb; 2. the localization of glia cells and the expression of the neurotransmitters in the multi-layered cynomolgus monkey olfactory bulb; 3. the effects of MPTP on the expressions of neurotransmitters and the impacts on glia cells and cell apoptosis. the impact of MPTP injury on the major neurotransmitters, apoptosis signals and glia cells via immunohistochemical me. All these provide fundamental knowledge for olfaction dysfunction of PD.

Part I The making of the MPTP-induced parkinsonism cynomolgus monkey models Methods: Six adult healthy cynomolgus monkeys were taken care of in the centre of the animals in accordance with the AAALAC(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care). Three animals were received intravenous injections of MPTP(0.2mg∕kg) under the individualization principle every morning(9:00am). Injections ceased when typical clinical symptoms emerged. The other three adult cynomolgus monkeys were as a control group.

Results: 10 ~14 days after injections, all the three monkeys showed a parkinsonism characterized by bradykinesia, loss of spontaneous activity, buckling posture, impairments of balance, myotonia, discontinuous rigidity, postural or static tremor that reached a disability scale of 10 and a week later the disease progressed and

Remained stable scoring 19.5±4.8 .

PartⅡThe impact on neurotransmitters of olfactory bulb in cynomolgus monkeys damaged by MPTP

Methods: The olfactory bulbs of MPTP group and normal group monkeys were transected and made into paraffin sections. 25 sections from each group were immunostained for DA and 5-HT respectively. 5 sections were selected out randomly to obtain digital images with a digital camera coupled to an Olympus IX71 microscope. These images were analyzed. We measured the mean optical density and counted the positive cell numbers via a IPP software to analyze these images.

Following the same procedure, then we examined the expressions of GABA and ChAT which were both amino acid neurotransmitters in cynomolgus olfactory bulb.

Also we examined the expressions of D1R、D2R、DARPP32、DAT in cynomolgus

Monkey olfactory bulb.

Results: The number of these transmitter positive cells and the mount of the positive fibers decreased.

PartⅢthe impact on glia cells of olfactory bulb in cynomolgus monkeys damaged by

MPTP

Methods: Immunohistochemical staining was performed to examine the localization and expression of Iba1、GFAP and TNF-αin the olfactory bulb both normal and MPTP group monkeys. We measured the numbers of these positive cells and the mean optical

Density of these positive elements to reflect the impact on glia cells of MPTP toxicity. Results: The positive elements of Ibal、GFAP and TNF-αincreased.

PartⅣthe impact on cell apoptosis of olfactory bulb in cynomolgus monkeys damaged by MPTP

Methods: Immunohistochemical staining was performed to examine the localization and expressions of Bcl2 and caspase3 in the cynomolgus monkey olfactory bulb. We measured the numbers of these positive cells and the mean optical density of these

Positive elements to reflect the impact on cell apoptosis of MPTP toxicity.

Results: Bcl2 positive elements decreased and caspase3 positive elements increased. Conclusions: MPTP toxicity causes altered neurotransmitters, abnormal cell apoptosis and glia cell hyperplasia and inflammation.

**Key words**: MPTP; Olfactory bulb; Cynomolgus monkey; Neurotransmitters apoptosis signal; Glia cell; Immunohistochemistry

前 **言**

自从1817年James Parkinson描述该病以来，帕金森病被传统的认为是出现运动迟缓，僵直，静息性震颤，姿态不稳等运动功能障的疾病。今天，帕金森病的非运动症状也逐渐被人们认识到，这些症状包括嗅觉障碍、味觉障碍、视力障碍、心血管功能失调、功能性消化不良、流涎症、皮脂腺活动异常、睡眠障碍、情绪和认知障碍[1~3]。其中最主要的是嗅觉障碍，不仅发生于至少90%的病例，而且常常先于运动障碍数年。该症状发生率远远高于既往被视为帕金森病经典症状的静息性震颤，也比帕金森病的其他主要症状发生率要高[4~6]。只不过因为80%以上的帕金森病人并没有完全丧失嗅觉而鲜于觉察[4~6]，另外，1984年宾夕法尼亚大学推出嗅觉诊断试纸之前，实用有效的量化的诊断手段尚未面世。自从有了这种嗅觉功能的测试手段之后，帕金森病存在嗅觉障碍的研究被正式的载入了文献[7~11]. Montgomery等人对40名帕金森病并发嗅觉障碍的患者的亲人进行了为期两年的前瞻性随访调查，发现10%的家属同样罹患帕金森病，他们也对帕金森病患者及家属做了单光子发射计算机体层摄影检查[11]，结果为：并发嗅觉障碍的帕金森病的亲属有12%存在多巴胺转运体的突触前异常，而那些未并发嗅觉障碍的帕金森病的亲属SPECT检查无异常，且他们也没有罹患帕金森病。

Haehner等人对400名帕金森病人进行了嗅觉功能的检测，其中51.7%的病人发生了嗅觉减退，45%发生了功能性嗅觉丧失，仅3.3%病人嗅觉正常。某种意义上，帕金森病可以被认为是以嗅觉障碍为主要症状且伴随着运动症状的的一种疾病。

迄今，帕金森病发生嗅觉障碍的机制并不清楚。目前考虑可能原因有：1.遗传因

素。研究表明不同的帕金森病致病基因突变对嗅觉功能的影响是不同的。Correia Guedes L等发现LRRK2基因G2019S突变的PD患者易于发生嗅觉障碍，而且也有研究发现除了具有这种突变的PD患者发生了嗅觉障碍，连携带者也出现了嗅觉障碍

[13~15]。2.相关蛋白的改变。帕金森病主要的病理改变是在变性的多巴胺能神经元中

出现以synuclein为主要成分的包涵体和Tau蛋白相关神经纤维的聚集。在发生嗅觉障碍的PD患者中发现了含有异常蛋白的包涵体和神经纤维的聚集也存在于杏仁核、嗅皮质等部位。[16~18] 3. PD患者出现嗅觉障碍与神经递质异常有关，除了多巴胺，还有其他类型的神经递质参与，这些神经递质的异常早于PD的病理变化，甚至可能促进PD的进程。[19~20] 4.环境因素的影响。PD的危险因素如年龄、脑外伤、病毒感染、金属离子、农药接触等，很可能是发生嗅觉减退的独立的危险因子[21]。

对疾病发病机制的探究离不开好的动物模型。MPTP非人灵长类帕金森病模型是迄今为止最接近于临床发病的PD实验模型。MPTP是最常用的一种制作帕金森病模型的药物，它通过破坏黑质-纹状体多巴胺递质系统使动物产生帕金森病症状。MPTP经食蟹猴的股静脉注射，造成系统性食蟹猴帕金森病的模型，临床症状明显的类似于病人的临床症状，且反应持久不可逆，病理变化，生化改变也与帕金森病人非常相似，故MPTP食蟹猴帕金森病模型作为研究帕金森病的动物模型十分理想[22~23]。

为了更好的理解帕金森病造成嗅觉障碍的原因，嗅觉系统的神经解剖是非常具有研究价值的。嗅觉系统是一个十分特殊的感官系统，它是惟一的与外周直接建立联系的中枢神经系统，具有很强的可塑性，终生不断的更新和再生，这也提示我们治疗存在嗅觉通路缺陷的嗅觉障碍患者可能有一条利用嗅觉系统可塑性的治疗手段。可以发现这一特点对于嗅通路中断的嗅觉障碍患者的治疗将是一条新的途径。嗅觉系统是由嗅上皮、嗅球和嗅皮层三部分组成。这三个部位的功能是哺乳动物能够精确的识别各种气味的基础。气味信息经黏膜上的感觉神经元向嗅球投射，再经嗅球的神经通路传入大脑皮层，形成嗅觉。而作为嗅觉系统关键部位的嗅球，很可能是帕金森病嗅觉障碍的病理基础之关键所在，因此对它的研究更是重中之重。人们逐渐了解到，嗅球不仅仅是嗅觉信息传递的中继站，它的功能

类似于其他感觉系统的主皮层，神经通路甚为复杂。嗅球与诸多的脑区形成神经纤维联系，不仅联系到产生嗅觉的相关结构，如副嗅区、杏仁核及habenular核等，还联系到海马、下丘脑及网状结构等。在传达皮层之前嗅球将对嗅觉信息处以最后的加工，故而被称为“嗅觉的下丘脑”[24~25]。现有的文献资料较多的研究嗅觉发达的动物和帕金森病人及正常人的嗅球，嗅觉不发达的非人灵长类动物在这方面的知识十分有限。我们的实验希望通过免疫组化的方法了解：1.食蟹猴嗅球的组织形态。2. 各神经递质在食蟹猴嗅球中的表达情况以及MPTP损伤对食蟹猴嗅球神经递质表达情况的影响。研究这些知识，可以为帕金森病嗅觉障碍的神经基础积累一定的相关资料。

# 第一部分 食蟹猴MPTP帕金森病系统性模型的建立

自从发现吸毒者产生的类似于帕金森病的急性的运动迟缓震颤等症状系自制海洛因中的MPTP引起之后，MPTP就被用于啮齿类动物和灵长类动物的帕金森病模型制作。经股静脉注射MPTP，制成系统性食蟹猴帕金森的模型，该模型不仅在症状、病理、生化方面与人类PD极为相似，而且对抗PD药物的反应包括副作用也与人类相似，是迄今最能反映人类PD特征的动物模型，从而广泛的应用于人类帕金森病的发病机制、诊断和治疗的研究。

## 1 材料和方法

动物及处理

成年健康食蟹猴6只，由广西南宁灵康赛诺科生物科技有限公司灵长类实验中心提供，所有动物均有详细的出生记录和检疫证书。所有动物均无明显的肢体的残损。实验中所有涉及动物的实验方案均得到了动物关怀与使用伦理委员会

(Institutional Animal Care and Use Committee)的认可。动物中心严格按照AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal

Care，国际实验动物评估和认可管理委员会）规定和要求对动物进行日常的饲养、关怀和管理。动物房温度保持在23~28℃，12/12h光暗交替，持续的纯净饮用水供应，每日给予常规猴料和新鲜水果。行为学分析实验在动物中心完成，由试验人员和专门的技术人员实施。

**行为学记录**个人计算机（组装）；网络摄像头（FL-309P，深圳飞盟电子公司）；宽频USB延长线（ZK-E01，广东力特电子有限公司）；摄像头控制数据采集软件

（Garuda，美国帕金森病研究所提供）；运动总量分析软件（Excel、宏程序，美国帕金森病研究所提供）；Excel 2000（美国微软公司）；数码摄像机（Sony HC21E,日本）；数码摄像带（Sony，日本）；网络路由器（RG-R714M，福建星网锐捷通讯有限公司）；视频采集盒（LKV328，深圳市朗强科技有限公司）；先锋DVD刻录机

（DVR-110EXL, 中国）；取食装置（自行设计制作）；行为观察笼（自行设计制作）；转移笼（自行设计制作）。在广西南宁灵康赛诺科生物科技有限公司灵长类实验中

心，由实验人员和专门行为学技术人员共同完成。麻醉方法

注射MPTP之前15分钟给予氯胺酮注射液（4～5mg/kg），肌肉注射，麻醉前30分钟给予阿托品注射液0.04mg/kg, 肌肉注射。

**MPTP**注射方法

采用小剂量连续给药方法，即0.2mg/kg MPTP-HCl溶液，于下肢静脉缓慢注入，每天早晨1次（9AM）。采用个体化原则，以出现典型的临床症状为注射终点。

**MPTP**溶液配制方法及使用**MPTP**的防护措施配制步骤

为了便于注射，配成浓度为0.2mg/ml溶液，将MPTP粉剂在通风厨中用微量天平准确分装成10mg放入Appendorf管中密封。配制MPTP溶液的量原则上是足够当天用的量，但最多不能超过两天的用量，注射当天，同样在通风厨中将盛有10mg

MPTP的Appendorf管用手掌式离心机离心使MPTP粉剂集中到管底，用加样枪吸取少量生理盐水溶解，盖上盖后混匀，另用50ml离心管用移液管加入无菌生理盐水30ml，然后将溶解的MPTP加入混匀，用生理盐水冲洗Appendorf管，然后加入离心管，如此反复3次，最后将离心管中生理盐水加至50ml混匀，用0.22μm一次性无菌滤器过滤至另一只离心管中即可。当日用后剩余的溶液冻存于专用的-20℃冰箱冷冻室内，注射之前1h解冻即可。

注射时注意事项

注射时根据需要的量，选用5ml或10ml注射器，抽取MPTP后随即连接头皮针，防止药液漏出，注射完毕后，不能拔针，只需取下注射器，再用抽取了无菌生理盐水的注射器连接头皮针并注入盐水2－3ml，将头皮针中残留的药液冲洗干净保证注入的MPTP的量。注射的整个过程要尽量防止MPTP漏出，注射速度约1 ml / min。防护措施

MPTP是神经剧毒药物，人类对其敏感性最强，故在使用MPTP的全过程中需严格遵守MPTP安全防护规程。

MPTP注射后的异常反应

在注射MPTP期间，会出现相应的异常的临床症状、异常反应和PD临床症状，应仔细观察并做好记录。

稳定期

需按程序观察记录实验猴一般状况、营养状况、体重变化，如出现异常情况需及时处理。

用Kurlan（1991）帕金森评分量表进行临床评分，注射MPTP期间及急性期至少需要两天评分1次，稳定期每周集中进行1次评分。

评分量表评定内容

面部表情（0～3分）；静止性震颤（0～3分）；动作性或意向性震颤（0～

3分）；姿势（0～2分）；步态（0～3分）；运动减慢（全身性）（0～4分）；平衡/协同功能（0～3分）；上肢粗大运动（0～3分）；下肢粗大运动（0～3分），防御反应（0～2分）。最小分数0分，最高分数29分。

## 2 结果

注射MPTP后10～14（12.0±1.67）天，临床评分达到10(10.5±0.55)分，此时所有实验猴均逐渐出现典型的运动损害症状，包括运动迟缓、随意运动活动减少、屈曲体态、姿势步态不稳，肌强直、间断性僵直发作及姿势性或静止性震颤。在其后约1周的时间（开始注射MPTP后18.8±2.9天）临床症状持续进展并进入相对稳定期，此时临床评分为（19.5±4.8）分。

## 3 结论

本实验采用小剂量连续给药的方法，造模结果证明MPTP的剂量、给药方法能够有效的建立起食蟹猴系统性帕金森病模型。临床症状的进程也可以提供很好的参考。

# 第二部分 MPTP损伤对食蟹猴嗅球中神经递质表达的影响

从提出化学突触传递以后，科学家对神经递质的化学特性进行了深入研究，每一种神经递质具有不同的生理功能。各种神经递质均有其相应的受体。对脑功

能的研究离不开神经递质及其受体的研究。在我们的实验中将使用免疫组化的方法观察几种主要的神经递质在嗅球中的分布情况，并且观察MPTP损伤是否影响了这几种神经递质在嗅球的表达。我们的实验观察的是多巴胺通路上的几种蛋白、胆碱乙酰基转移酶、5-羟色胺、γ-氨基丁酸这几种神经递质在食蟹猴嗅球上的表达情况。

## 1 材料和方法

材料

动物及处理

由广西南宁灵康赛诺科生物科技有限公司提供6只健康成年食蟹猴（4雌，2雄），动物饲养按照国际AAALAC(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, 国际实验动物评估和认可管理委员会)灵长类动物的标准，动物的病原体检疫和生物安全检验均合格。实验中所有涉及到动物的实验方案均得到了动物关怀与使用伦理委员会（Institutional Animal Care and Use Committee）的认可。动物中心严格按照AAALAC的规定和要求对动物进行着日常的饲养、关怀和管理。动物房温度保持在23~28℃，12h/12h明暗交替，纯净饮用水持续供应，每日饲以常规猴料和新鲜水果。

3只食蟹猴作为对照组，另3只食蟹猴（2雌1雄）施以下肢静脉注射MPTP，浓度为0.2 mg/ml，按照动物体重计算MPTP注射量(0.1mg/kg)，每间隔1d注射一次，共注射21次，帕金森临床评分达到10分时（平均12.0±1.67），以戊巴比妥钠麻醉动物，施以内灌注固定，开颅取出嗅球，外固定，石蜡包埋嗅球，做5μm切片。试剂

Mouse anti-DA抗体，用封闭液1∶500稀释（Abcam）

Mouse anti- DARPP32抗体，用封闭液1∶200稀释（Santa Cruz）

Rat anti-D1 Dopamine Receptor抗体，用封闭液1: 150稀释（Sigma）Rabbit anti-D2 Dopamine Receptor抗体，用封闭液1: 300稀释(Chemicon) Human anti-Dopamine Transporter抗体，用封闭液1: 200稀释(Chemicon) Rabbit anti-GABA抗体，用封闭液1: 500稀释(Abcam)

Mouse anti-ChAT抗体，用封闭液1: 100稀释(Abcam)免疫组化染色试剂盒

3%H2O2去离子水

封闭用正常ft羊血清工作液

生物素标记ft羊抗大鼠小鼠兔IgG辣根酶标记链霉卵白素工作液

苏木素染色液（中杉金桥）

DAB显色试剂盒实验方法

免疫组织化学SABC染色

免疫组织化学SABC染色法操作步骤

1.石蜡切片依次经过二甲苯Ⅰ、Ⅱ(各30min),1∕2二甲苯、100%酒精﹑90﹪酒精、

80﹪酒精、70﹪酒精（各10min），进行脱蜡，脱二甲苯。

2.双蒸水洗3min×2,0.01mol∕L PBS洗3min×3.

3.3％H2O2 15min灭活内源性酶。

4 PBS洗3min×3

5 0.5％triton-X-100,10min 6 PBS洗3min×3

7热修复抗原：0.01M枸橼酸盐缓冲液（PH6.0），微波4min×2，自然冷却

8 PBS洗3min×3

## 9 1%BSA封闭液，滴一滴，30min,吸去封闭液，不洗

10滴上抗体稀释液，抗DA抗体稀释至0.2%，抗5-HT抗体稀释至0.5%，抗GABA抗体稀释至0.2%，抗ChAT抗体稀释至1%，抗D1R抗体稀释至0.66%,抗D2R抗体稀

释至0.33%，抗DAT抗体稀释至0.5%，抗DARPP32抗体稀释至0.5%。4℃过夜。

## 11 PBS洗3min×3

## 12 生物素标化第二抗体，37℃，30min

## 13 PBS洗3min×3

## 14 SABC, 37℃，30min

## 15 PBS洗5min×3,时间可相应延长

16 DAB显色试剂盒，1ml试剂2中加入1滴试剂1，配好滴入切片上。镜下控制显色。控制抗DA抗体的显色时间为5分钟，抗5-HT抗体的显色时间为1分钟30秒。抗ChAT抗体的显色时间为2分钟30秒，抗GABA抗体的显色时间为1分钟。抗D1R抗体显色时间为5分钟，抗D2R抗体的显色时间为5分钟，抗DAT抗体的显色时间为2分钟，抗DARPP32抗体的显色时间为1分钟。

## 17 双蒸水冲洗2min

## 18 梯度酒精脱水，二甲苯透明，封片。免疫组化图片的拍摄及分析

正确地拍摄照片是图像分析的基础。所有的照片必须以同样的显微镜环境与拍摄条件来拍摄。拍摄照片要保持显微镜光源亮度稳定，以同样的曝光时间拍摄照片。更换视野或切片时，除了对焦距这个动作外，其他所有的操作都应当没有变化。奥林巴斯荧光倒置显微镜IX71拍摄。

免疫组化图片分析的原理为：根据染色染料颜色的深浅（光密度）及分布面积大小来确定目标蛋白的量。光密度是吸收光的物质的光学密度，直接与染色物质的量相关。黄色深浅与组织细胞内特定蛋白表达量成正相关关系，是一种半定量的分析方法。该实验选用的图像分析软件是Image-Pro Plus。通过作光密度校正，设置测量参数，描绘测量区域，设置色彩选择，测量计算出平均光密度的值，

最终比较的是两张照片之间的平均光密度数值。我们也通过该软件进行细胞计数。每种抗体从25张切片中随机选取5张切片，在每张的染色区域内均匀的选择

10个视野，同一天内摄片，测平均光密度，计阳性细胞数。数据统计分析

实验数据作均数±标准差（Mean±SD），组间的差异用SPSS16.0软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 1. 食蟹猴嗅球的组织形态结构

根据细胞种类和细胞构成，嗅球的结构在组织形态学上有明确的区域。嗅球断面呈近似同心圆状的分层结构，由外往内分别是突触小球层（glomerular layer，

GL）、外网状层（external plexiform, EPL）、僧帽细胞层（mitral cell layer,

MCL）、内网状层（internal plexiform layer, IPL）、颗粒细胞层（granule cell layer, GCL）。嗅球的组织结构层次划分以细胞的类型和组成而定。外层的突触小球层是由数种树突和轴突的反复分支构成的球状体，突触小球周围有小球周细胞。外网状层主要由僧帽细胞和刷状细胞的树突形成网状结构。僧帽细胞层由僧帽细胞的胞体构成，而内网状层和颗粒细胞层主要由颗粒细胞的胞体构成，而颗粒细胞是嗅球中数量最多的细胞类型。

我们的实验结果呈现出食蟹猴嗅球的组织结构：外层的为突触小球层。数种树突和轴突的反复分支构成的球状体，球体大小不一，较圆，有的呈分叶状。球体内纤维呈毡状，球体的周围由较为密集且胞体较小的细胞构成边界，突触小球层以内为外网状层，该层较为宽阔，其内细胞散在，僧帽细胞层由数层僧帽细胞组成，僧帽细胞排列疏松不整，僧帽细胞层深面为内网状层，较窄，嗅球的中心为区域较大的颗粒细胞层，其内密布颗粒细胞。

### 2. 各神经递质在食蟹猴嗅球的分布特点

图1所示为食蟹猴横断面组织结构，免疫组化SABC法染色示嗅球内D2R阳性物质，苏木素复染。我们可以观察到明显的分层结构，近似同心圆。核心区域为

颗粒细胞层，细胞数量较多，环绕颗粒细胞层的为内网状层，较窄，是细胞数量较少的一圈狭窄的环形区域，内网状层外侧为僧帽细胞层，该层细胞密集，僧帽细胞层外为外网状层，该层区域宽阔，细胞散在，排布疏松，用抗D2R抗体作SABC染色后该层显色最深，其内是神经纤维形成的网状结构，外网状层外是突触小球层，其内为大小不一的球状体，每个球状体的边界是由体积较小的细胞围成，其内是神经纤维。

DA能神经元分布于突触小球层、外网状层、僧帽细胞层、内网状层、颗粒细胞层各层，数量较多，且胞体大小不一，纤维分布广泛，遍及整个嗅球。

5-HT能神经元分布于突触小球层、外网状层、颗粒细胞层。纤维遍及整个嗅

球。

胆碱类神经递质ChAT自身化学性质很不稳定，在生物组织内释放后又极易被胆碱酯酶水解，给研究中枢胆碱能神经元的分布和纤维联系带来很大困难。这里我们选择抗ChAT的抗体，ChAT是神经元内ACh合成的特异酶，与乙酰胆碱在中枢神经系统内的分布颇为一致。我们观察到ChAT阳性细胞见于突触小球层。ChAT阳性纤维见于突触小球层、外网状层。突触小球以内各层再没有发现ChAT阳性细胞，并且外网状层以内ChAT阳性纤维越来越稀疏，染色也越来越淡。

GABA能神经元见于嗅球各层，且颗粒细胞层也可见大量的GABA能神经元，阳性纤维遍及整个嗅球。

多巴胺通路上D1R、D2R、DAT神经元分布情况：

D1R阳性神经元见于突触小球层，阳性纤维见于突触小球层。

D2R阳性神经元见于突触小球层、外网状层、僧帽细胞层、内网状层、颗粒细胞层。D2R阳性纤维分布于嗅球各层，其中以外网状层尤为显著。

DAT阳性细胞见于嗅球的各层。DAT阳性纤维多见于突触小球层和外网状层，外网状层阳性纤维主要见于外侧。

DARPP32阳性细胞见于突触小球层和颗粒细胞层。DARPP32阳性纤维见于内网状层和颗粒细胞层，颗粒细胞层内阳性纤维呈簇状，纤维走向大致与颗粒细胞层的周边垂直，内网状层内纤维密集，纤维走向大致与内网状层周边平行。

MPTP损伤对食蟹猴嗅球神经递质的影响

与对照组比较，MPTP组的DA神经元数量明显下降，阳性细胞体积减小，染色变淡。计DA阳性细胞数，发现MPTP组的切片在放大400倍的每视野下仅2 ~3个，而对照组每视野平均5~6个，减少的程度很大（P﹤0.01）（见图2）。

与对照组相比，另一种单胺类神经递质5-HT经MPTP损伤后阳性神经元的数量显著下降，400倍下每视野平均1~3个，而正常组每视野3~5个，阳性细胞计数下降的程度近一半（P﹤0.01）（见图2）。

观察氨基酸类神经递质，与对照组比较，MPTP组的ChAT阳性神经元数量下降，计ChAT阳性细胞数，发现MPTP组的切片在放大400倍的每视野下鲜见阳性细胞，而对照组每视野平均0~4个，计GABA阳性细胞数，发现MPTP组的切片在放大400倍的每视野下1~5个，而对照组8~10个（图5）。

计DAT阳性细胞数，发现MPTP组每视野0~2，而对照组14~15个，下降程度非常显著。与对照组比较，MPTP组的DARPP32阳性细胞数量减少，400倍下每视野平均4个，而正常组每视野6~7个，阳性细胞计数下降的程度超过1/3（P﹤0.01）。计D1R阳性细胞数，与对照组比较，MPTP组每视野0~1个，而对照组0~2个。计

D2R阳性细胞数，与对照组比较，MPTP组每视野4~5个，而对照组6~9个（见图8）。与对照组比较，MPTP组的DA和5-HT阳性神经纤维减少（见图3），以DA 阳

性神经纤维明显（P﹤0.01）采用Image-Pro Plus 6.0软件半定量分析单胺类神经递质阳性神经纤维量的变化，得出：单胺类神经递质DA和5-HT的阳性纤维量减少（见图4）。

与对照组比较，MPTP组的ChAT和GABA阳性神经纤维减少（见图6），采用Image-Pro Plus 6.0软件半定量分析氨基酸类神经递质阳性神经纤维量的变化，得出：氨基酸类神经递质ChAT和GABA的阳性神经纤维量减少（见图7）。

与对照组比较，MPTP组的DARPP32、D1R、D2R、DAT阳性神经纤维减少（见图9），采用Image-Pro Plus 6.0软件半定量分析氨基酸类神经递质阳性神经纤维量的变化，得出：多巴胺系统中的受体、转运体、信号分子D1R、D2R、DAT、DARPP32阳性纤维量也减少（见图10）。

## 3 结论

1. 食蟹猴嗅球横断面呈近似同心圆的分层结构，包括突触小球层、外网状层、僧帽细胞层、内网状层、颗粒细胞层。突触小球层为大小不一的球状体聚集而成，球体内为神经纤维网，球体的边界由细胞围成，该处细胞体积不大，分布不均，外网状层宽阔，其内细胞散乱，僧帽细胞层细胞体积较大，细胞数层，内网状层较窄，内网状层以内为颗粒细胞层，也是嗅球横断面的核心，细胞密布。

2. 中枢神经系统几种重要的神经递质，我们所观察的单胺类神经递质DA、5-HT和氨基酸类神经递质ChAT、GABA，在食蟹猴嗅球内均有表达，从而提示食蟹猴嗅球内的神经回路是存在着神经递质之间的相互影响，非常复杂。DA、5-HT、GABA的阳性细胞和阳性纤维在嗅球各组织层次中广为分布，提示嗅球内的不同类型细胞，包括僧帽细胞、颗粒细胞、刷状细胞、小球周细胞甚至胶质细胞都可能合成分泌这几种神经递质或是存在着这几种神经递质的受体。ChAT阳性细胞在嗅球内鲜见，阳性纤维在嗅球的中心部位分布较少，提示嗅球内部的胆碱能神经支配可能系嗅感觉神经元的胆碱能神经纤维传入。

## 4 小结

### 1. MPTP对食蟹猴嗅球单胺类神经元有毒性作用，表现为单胺类神经元数量的减少和单胺类神经递质表达的下降。

### 2. MPTP对食蟹猴嗅球氨基酸类神经元有毒性作用，表现为氨基酸类神经元数量的减少和氨基酸类神经递质表达的下降。

第一部分附图

图1 食蟹猴嗅球横断面组织结构

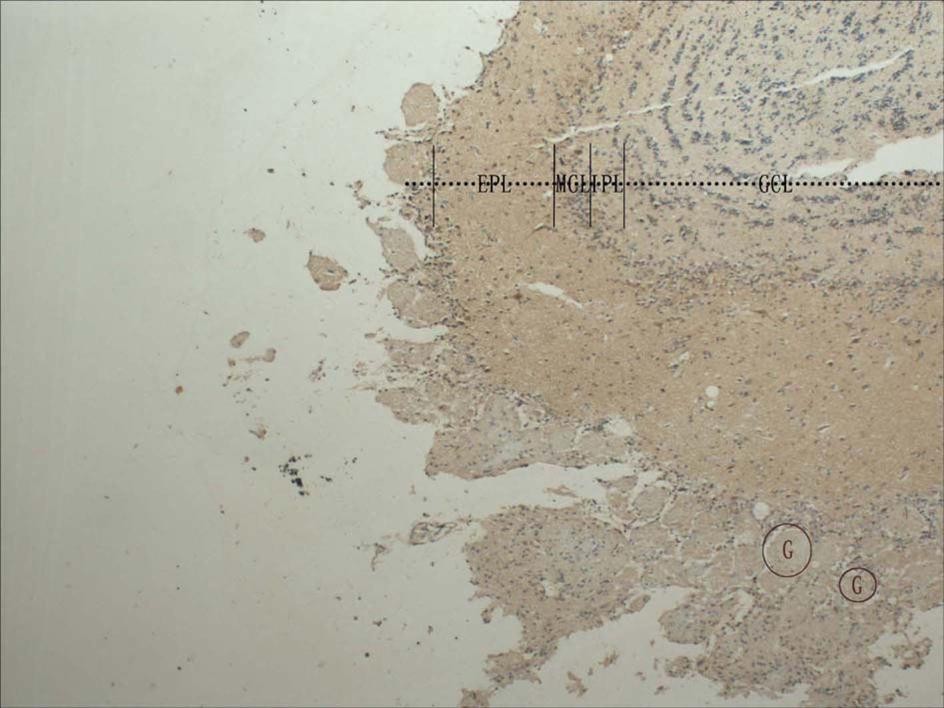


Fig 1: the multi-layered cellular architecture of the olfactory bulb of cynomolgus monkey

D2R positive elements in the olfactory bulb of cynomolgus monkey

Granule cell layer (GCL); mitral cell layer (MCL); external plexiform layer (EPL); a glomerulus(G) ;

Original magnification×100

图2 MPTP对食蟹猴嗅球单胺类神经递质阳性细胞的影响

Fig 2 The effects of MPTP on monoamine neurotransmitter positive cells in the cynomolgus olfactory bulb Original magnification×400

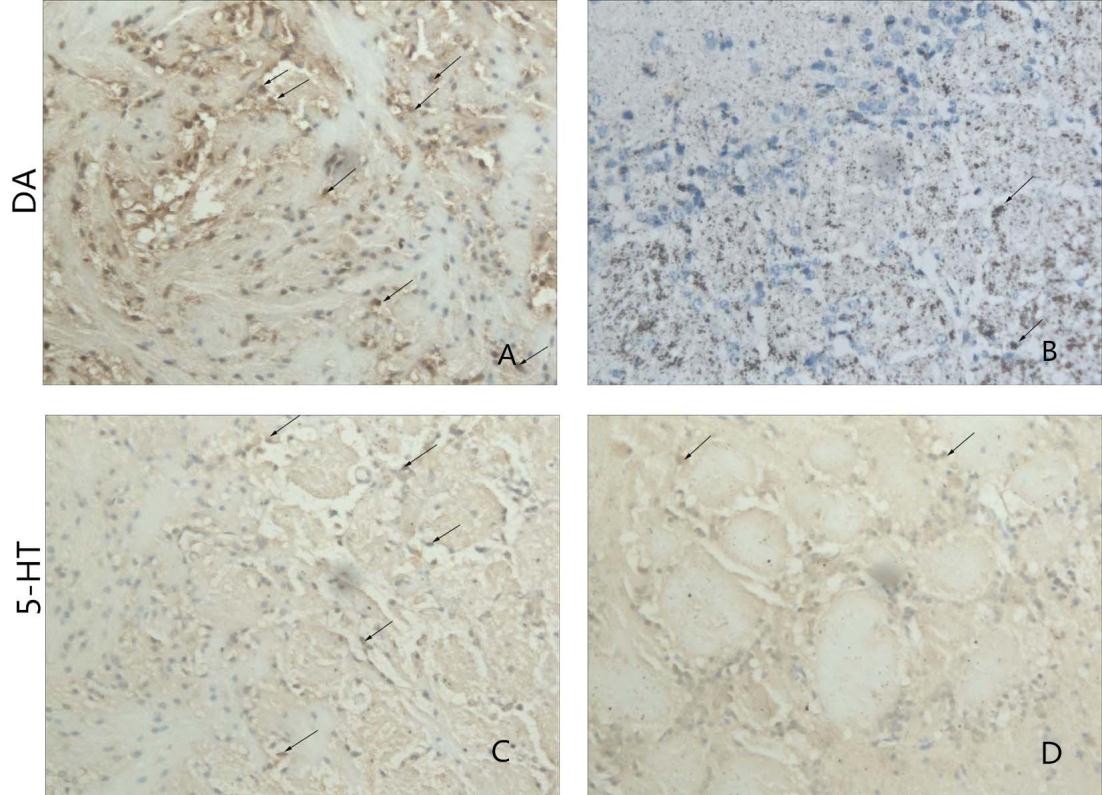


图3 MPTP对食蟹猴嗅球单胺能神经递质阳性纤维的影响

Fig 3 The effects of MPTP on monoamine neurotransmitter positive fibers in the cynomolgus olfactory bulb Original magnification×200



图4 半定量分析MPTP对食蟹猴嗅球单胺能神经递质的影响

Fig 4 semi-quantitative analysis of the effects of MPTP on monoamine transmitter positive cells and fibers in the cynomolgus olfactory bulb

7

6

5

4

3

2

1

0

\*

\*

对照组

模型组

DA 5-HT

注：

the number of positive neurons

与对照组比较，\*P﹤0.05。

Compared with control group, \*P﹤0.05.

mean optical density

0.12

0.1

0.08

0.06

\*

对照组

模型组

0.04

0.02 \*

0

DA 5-HT

注：

与对照组比较，\*P﹤0.05。

Compared with control group, \*P﹤0.05.

图5 MPTP对食蟹猴嗅球氨基酸类神经递质阳性细胞的影响

Fig5 The effects of MPTP on amino acid neurotransmitter positive cells in the cynomolgus olfactory bulb Original magnification×400



图6 MPTP对食蟹猴嗅球氨基酸类神经递质阳性纤维的影响

Fig 6 The effects of MPTP on amino acid neurotransmitter positive fibers in the cynomolgus olfactory bulb Original magnification×200



图7 半定量分析MPTP对食蟹猴嗅球氨基酸类神经递质表达的影响

Fig 7 semi-quantitative analysis of the effects of MPTP on amino acid transmitter positive cells and fibers in the cynomolgus olfactory bulb

\*

\*

9

8

7

6

阳性细胞数

5

4

3

2

1

0

ChAT GABA

对照组模型组

0.09

0.08

0.07

0.06

平均光密度

0.05

0.04

0.03

0.02

0.01

0

ChAT GABA

\*

\*

对照组模型组

注：

与对照组比较，\*P﹤0.05。

Compared with control group, \*P﹤0.05.

图8 MPTP对食蟹猴嗅球多巴胺系统功能蛋白阳性细胞的影响

Fig8 The effects of MPTP on dopamine correlative protein positive cells in the cynomolgus olfactory bulb



图9 MPTP对食蟹猴嗅球多巴胺系统功能蛋白阳性纤维的影响

Fig9 The effects of MPTP on dopamine correlative protein positive fibers in the cynomolgus olfactory bulb



0.2

0.18

0.16

0.14

0.12

0.1

0.08

0.06

0.04

0.02

0

\*

\*

对照组

模型组

\*

\*

DARPP32 D1R D2R DAT

平均光密度

图10 半定量分析MPTP对食蟹猴嗅球多巴胺系统功能蛋白表达的影响

18

16

14

12

10

8

6

4

2

0

对照组

模型组

\*

\*

\*

\*

DARPP32 D1R D2R DAT

Fig 10 semi-quantitative analysis of the effects of MPTP on dopamine system correlative protein positive cells and fibers in the cynomolgus olfactory bulb

阳性细胞数

# 第三部分 MPTP损伤对食蟹猴嗅球胶质细胞的影响

作为神经退行性变疾病，帕金森病的发病机制也离不开炎症反应和免疫反应。参与神经系统免疫的胶质细胞也日益成为研究的重点，且嗅觉中枢的炎性反应也可能是帕金森病嗅觉障碍的病因。例如，小胶质细胞在炎性刺激下会有增生反应，该实验通过比较MPTP组食蟹猴嗅球的胶质细胞标志性蛋白（Iba1可以视为小胶质细胞的一种标志性蛋白，GFAP可以视为星形胶质细胞的一种标志性蛋白）表达的变化了解胶质细胞在MPTP损伤后的一些情况，同时我们也观察炎性因子TNF-α在

MPTP损伤后表达的变化。

## 1 材料和方法

食蟹猴嗅球石蜡切片20 张

Goat anti-Iba1抗体用封闭液1: 200稀释Rabbit anti-GFAP抗体用封闭液1: 500稀释Mouse anti-TNF-α抗体用封闭液1: 50稀释

Donkey anti-goat IgB第二抗体用封闭液1: 200稀释

1%驴血清

免疫组化染色试剂盒

3%H2O2去离子水

封闭用正常ft羊血清工作液辣根酶标记链霉卵白素工作液苏木素染色液（中杉金桥）

DAB显色试剂盒

奥林巴斯荧光倒置显微镜IX71

实验方法Iba1的SABC法染色，核复染：

1.石蜡切片依次经过二甲苯Ⅰ、Ⅱ(各30min),1∕2二甲苯、100%酒精﹑90﹪酒精、

80﹪酒精、70﹪酒精（各10min），进行脱蜡，脱二甲苯。

2.双蒸水洗3min×2,0.01mol∕L PBS洗3min×3.

3.3％H2O2 15min灭活内源性酶。

4 PBS洗3min×3

5 0.5％triton-X-100,10min 6 PBS洗3min×3

7热修复抗原：0.01M枸橼酸盐缓冲液（PH6.0），微波4min×2，自然冷却

8 PBS洗3min×3

9驴血清用生理盐水稀释成1%浓度。1%驴血清封闭液，滴一滴，30min,吸去封闭液，不洗。滴上抗体稀释液，稀释浓度至0.5％，4℃过夜

11 PBS洗3min×3

## 12 用1%驴血清稀释驴抗羊第二抗体至0.5%浓度，驴抗羊第二抗体，37℃，30min

## 13 PBS洗3min×3

## 14 SABC, 37℃，30min

## 15 PBS洗5min×3,时间可相应延长

16 DAB显色试剂盒，1ml试剂2中加入1滴试剂1，配好滴入切片上。镜下控制显色。抗Iba1抗体显色时间为5分钟。

## 17 双蒸水冲洗2min

## 18 梯度酒精脱水，二甲苯透明，封片。

GFAP、TNF-α的SABC染色法大致同前。抗GFAP抗体稀释至0.2％，抗TNF-α抗体稀释至2％，抗GFAP抗体显色时间为1分钟，抗TNF-α抗体显色时间为1分钟。显微镜摄片及免疫组化图片分析

T检验分析

## 2 结果

Iba1阳性物质在食蟹猴嗅球的分布

Iba1阳性细胞主要见于突触小球层和外网状层，以小球周多见，胞体尚未形成分枝状，体积较小，Iba1阳性纤维主要见于部分突触小球。

GFAP阳性物质在食蟹猴嗅球的分布

GFAP阳性细胞各层均可见，以小球周为多，GFAP纤维也遍及整个嗅球，纤维分支且较长，与染色的胞体连在一起呈星状。

MPTP损伤对Iba1阳性细胞和纤维的影响

计Iba1阳性细胞数，发现MPTP组的切片在放大400倍的每视野下8~12个，而对照组每视野平均6~10个（见图11）。

与对照组比较，MPTP组的Iba1阳性纤维减少（见图12），采用Image-Pro Plus

6.0软件半定量分析其阳性纤维量的变化，得出：MPTP损伤后Iba1阳性纤维量也增多（见图13）。

MPTP损伤对GFAP阳性细胞和纤维的影响

MPTP组的GFAP阳性细胞数量增加，400倍下每视野平均5~9个，而正常组每视野3~7个（见图11）。

与对照组比较，MPTP组的GFAP阳性纤维减少（见图12），采用Image-Pro Plus

6.0软件半定量分析其阳性纤维量的变化，得出：MPTP损伤后GFAP阳性纤维量也增多（见图13）。

## 3 结论

MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球小胶质细胞和星形胶质细胞的增生，推测MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球的炎症反应和免疫反应。

# 第四部分 MPTP损伤对细胞凋亡的影响

细胞凋亡是生物界普遍存在的一种基本生命现象。与细胞坏死不同，细胞凋亡是细胞在生理或病理条件下由基因控制的死亡过程，是一种主动性细胞死亡，细胞凋亡的分子机制涉及细胞外和细胞内的多种因素，现已发现，caspase 3在神经退行性疾病的病理过程中担任重要的角色，它不仅是起着凋亡的效应器作用，还能直接与帕金森病，阿尔茨海默病等疾病的致病蛋白质分子相互作用，参与致病过程。而Bcl2是目前已发现的哺乳动物细胞中Bcl2基因家族成员中的一员，bcl-2的功能是通过阻断细胞凋亡而促进细胞存活。我们的实验通过免疫组化SABC染色的方法来观察嗅球中凋亡信号分子Bcl2和caspase在MPTP处理后是否发生了变化。选用的两种抗体的靶向蛋白有两种，caspase3和Bcl-2。

## 1 材料和方法

材料

食蟹猴嗅球石蜡切片20 张

Rabbit anti-caspase3抗体用封闭液1: 25稀释Rabbit anti-Bcl2抗体用封闭液1: 100稀释

免疫组化染色试剂盒

3%H2O2去离子水

封闭用正常ft羊血清工作液生物素标记ft羊抗兔IgG

辣根酶标记链霉卵白素工作液苏木素染色液（中杉金桥）

DAB显色试剂盒

奥林巴斯荧光倒置显微镜IX71实验方法免疫组化SABC染色

免疫组织化学SABC染色法操作步骤

### 1. 石蜡切片依次经过二甲苯Ⅰ、Ⅱ(各30min),1∕2二甲苯、100%酒精﹑90﹪酒精、

80﹪酒精、70﹪酒精（各10min），进行脱蜡，脱二甲苯。

### 2. 双蒸水洗3min×2,0.01mol∕L PBS洗3min×3。

3.3％H2O2 15min灭活内源性酶。

### 4. PBS洗3min×3

5. 0.5％triton-X-100,10min

### 6. PBS洗3min×3

### 7. 热修复抗原：0.01M枸橼酸盐缓冲液（PH6.0），微波4min×2,自然冷却

### 8. PBS洗3min×3

### 9. 1%BSA封闭液，滴一滴，30min,吸去封闭液，不洗

### 10. 滴上抗体稀释液，稀释浓度Bcl2为1%，caspase3为4%。4℃过夜

### 11. PBS洗3min×3

### 12. 生物素标化第二抗体，37℃，30min

### 13. PBS洗3min×3

### 14. SABC, 37℃，30min

### 15. PBS洗5min×3,时间可相应延长

16. DAB显色试剂盒，1ml试剂2中加入1滴试剂1，配好滴入切片上。镜下控制显色时间。Bcl2为4分钟，caspase3为5分钟。

17. 双蒸水冲洗2min

### 18. 梯度酒精脱水，二甲苯透明，封片。显微镜摄片及免疫组化图片分析

T检验分析

## 2 结果

嗅球各组织层次内均有Bcl2触小球层和外网状层最为密集。计Bcl2阳性细胞

数，发现MPTP组的切片在放大400倍的每视野下4~8个，而对照组每视野平均32~38个，MPTP组的caspase3阳性神经元数量增加，400倍下每视野平均92~102个，而正常组每视野18~22个。测量平均光密度，MPTP组与对照组比较，Bcl2下降而

caspase上升（见图14-16）。

## 3 结论

MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球的Bcl2表达量的减少和caspase3表达量的增加，提示MPTP损伤引起食蟹猴嗅球内细胞凋亡的异常，呈上调。

# 第三部分 附图

图11 MPTP损伤对食蟹猴嗅球Iba1、GFAP、TNF-α阳性细胞的影响

Fig11 The effects of MPTP on Iba1、GFAP、TNF-αpositive cells in the olfactory bulb



图12 MPTP损伤对食蟹猴嗅球Iba1、GFAP、TNF-α阳性纤维的影响

Fig12 The effects of MPTP on Iba1、GFAP、TNF-αpositive fibers in the olfactory bulb



图13 半定量分析MPTP损伤对Iba1、GFAP、TNF-α阳性细胞和纤维的影响

Fig 16 semi-quantitative analysis of the effects of MPTP on Iba1、GFAP、TNF-αpositive cells and fibers

\*

\*

\*

25

20

阳性细胞数

15对照组

10模型组

5

0

Iba1 GFAP TNF-α

0.14

0.12

0.1

平均光密度

0.08

0.06

0.04

0.02

0

Iba1 GFAP TNF-α

\*

\*

\*

对照组模型组

# 第四部分 附图

图14 MPTP损伤对食蟹猴嗅球凋亡标志物阳性细胞的影响

Fig11 The effects of MPTP on apotosis marker positive cells in the olfactory bulb



图15 MPTP损伤对食蟹猴嗅球凋亡标志物阳性纤维的影响

Fig15 The effects of MPTP on apotosis marker positive fibers in the olfactory bulb



图16 半定量分析MPTP损伤对凋亡标志物阳性细胞和纤维的影响

Fig 16 semi-quantitative analysis of the effects of MPTP on apotosis marker positive cells and fibers

120

100

80

阳性细胞数

60

40

20

0

Bcl2 caspase3

\*

\*\*

对照组模型组

0.2

0.18

0.16

0.14

平均光密度

0.12

0.1

0.08

0.06

0.04

0.02

0

Bcl2 caspase3

\*

\*

对照组模型组

# 讨论

帕金森病的嗅觉障碍

Ansari等人早期作出的研究即证明神经退行性疾病与嗅觉功能相关，包括帕金森病，阿尔茨海默病等。Ansari等人发现帕金森病患者的嗅觉阈值比正常对照组高。之后大量的研究发现帕金森病和嗅觉障碍的关联[26~30]。总体来说，嗅觉功能障碍与PD病程进展关联并不明显，嗅觉障碍在病程中相对稳定。临床证据显示嗅觉障碍常常发生在典型的帕金森病运动症状之前，嗅觉功能测试是一种明确该病诊断的有效测量方法。宾夕法尼亚大学嗅觉诊断测试被大量的应用证实了其诊断价值，但是PD患者的主观嗅觉识别阈不仅与嗅觉功能相关，还与主观因素密切相关，所以，需要客观的检查来对PD患者的嗅觉功能进行探讨[31~32]. Hawker等人对72例帕金森病患者的嗅觉事件相关电位进行了检测，发现36例患者有嗅觉诱发电位的缺失。综上所述，嗅觉障碍是帕金森病重要的临床表现。目前，帕金森病没有根治的治疗手段，仍以保护神经和替代治疗为主，因此早期诊断帕金森病对于及时治疗，提高患者生活质量十分有意义。单纯的依靠运动症状诊断帕金森病有较高的误诊率，嗅觉诊断不失为一种相佐的手段。并且，随着对帕金森病嗅觉障碍机制的逐步研究，我们对帕金森病的了解将突破传统的认知，也将会为治疗帕金森病找到新的手段。

嗅觉系统的神经解剖

嗅觉系统是一个具有三级结构的感觉系统，能够察觉并处理嗅觉信息。按解剖结构来分，嗅觉系统可以被分为嗅上皮、嗅球和嗅觉皮层三个部分。气味物质的信息先在鼻腔内的嗅上皮与嗅感觉细胞相互作用，嗅球为嗅觉的低级中枢，是嗅觉通路的枢纽。嗅球呈分层状结构，由外到内顺次为嗅感觉神经层、突触小球层、外网状层、僧帽细胞层、内网状层和颗粒细胞层。分布于内的神经元有僧帽细胞、刷状细胞、球周细胞和颗粒细胞。作为嗅觉传导通路末梢与中枢衔接点的嗅球，它内部的神经元及其突起建立了极为复杂的突触联系，且分布也有一定的规律。嗅皮层包括嗅球中僧帽细胞和刷状细胞的轴突投射到大脑内的所有区域，

包括：AON、嗅结节﹑梨状皮层的前部和后部﹑杏仁体周围区等[33~38]。嗅觉系统内部和嗅觉系统与外界之间建立的神经联系非常复杂，为了更好的理解帕金森病嗅觉障碍的发病机制，对嗅觉系统的研究是必要的。

食蟹猴帕金森模型的建立

MPTP是偶然被发现具有致PD样作用。MPTP的脂溶性高，容易通过血-脑屏障。在脑内，它可被胶质细胞摄取，经单胺氧化酶-β的催化生成MPDP﹢，再生成MPP﹢，

MPP﹢选择性的抑制线粒体复合物Ⅰ的活性，影响线粒体电子链的传递与氧化磷酸化，使细胞的能量供给发生障碍，继发性的激活谷氨酸介导的神经毒机制，使细胞内钙离子的浓度升高，从而使下游细胞损伤信号转导途径激活，导致细胞死亡，此外，在MPP+代谢中产生大量的自由基，形成的自由基可催化细胞的氧化应激过程，从而诱导细胞氧化损伤，导致细胞功能障碍和死亡。MPTP所制备的PD实验模型从机制上来讲，与神经元细胞的自身氧化应激损伤极为相似，因此被认为是一个比较接近非家族基因突变PD患者的发病情况[39~41]。

这里，我们选来建立MPTP系统性帕金森模型的实验动物是非人灵长类食蟹猴。种属之间对MPTP的敏感性有差异，在制作帕金森病动物模型时，应该根据自己的实验目的和实验条件来选择合适的实验动物。接受MPTP处理的灵长类动物由于其临床症状明显的类似于病人的临床症状，而且反应持久且不可逆，病理变化、生化改变也与帕金森病人非常相似，因此灵长类动物是一种最为理想的帕金森病动物模型。

MPTP损伤对食蟹猴嗅球神经递质的影响

帕金森病的病理特征为黑质致密部的多巴胺神经元大量退化和丢失。采用荧光组织化学、免疫细胞和组织化学方法可以显示出多巴胺能神经元在中枢神经系统的分布，证实嗅球内也存在多巴胺能神经元的分布。我们的实验首先选择观察多巴胺通路上的几种蛋白：DA、D1R、D2R、DARPP32和DAT。多巴胺是神经系统中一类重要的儿茶酚胺类神经递质，人类生命所依赖的躯体运动和思维活动都与多巴胺的功能紧密的联系在一起。多巴胺通过黑质-纹状体通路调节机体的运动功能。研究表明，多巴胺能活力增强可使运动增强，其递质释放可能是一切行为反

应的基本条件[42~43]。根据DA对腺苷酸环化酶活力的不同影响和受体识别的特性，提出DA受体有两种类型，即D1R和D2R. D1受体家族兴奋后，Gs被激活，从而催化ATP形成CAMP，激活CAMP依赖性蛋白激酶，催化蛋白质磷酸化，进而改变细胞膜对离子的通透性、调节递质合成酶的活力或导致其他效应。D2受体激活后，抑制AC的活性，减少CAMP生成，并可激活K+通道，使K+外流，K+电导增加，引起细胞膜超极化，并限制电压依赖的Ca2+内流等作用。在多巴胺神经元的靶细胞中有一种D1受体的信号分子，具有被磷酸化的位点而得名为DARPP32. DARPP32是体内调节D1受体功能的重要因子，也可能参与DA和其他递质之间的功能整合[44~46]. DAT转运释放在突触间隙中的DA重摄取回胞质。通过这五种蛋白在嗅球中的表达，我们可以初步了解嗅球多巴胺通路的概况。

虽然不是直接的联系，多巴胺与帕金森病的嗅觉障碍具有相关性，体现在：对动物行为学研究明确的表明了多巴胺对嗅觉功能的影响。譬如，大鼠腹腔内注射SKF 38393（一种D1R受体的选择性不完全激动剂）增强了动物察觉气味的能力，而多巴胺D2受体激动剂quinpirole则削弱了这种能力[47]。缺乏DAT或D2R的小鼠存在着气味辨别能力的不足。其二，除了黑质密部多巴胺系统的退行性变已证实，中脑腹侧被盖区也存在多巴胺能神经元的退行性变，而中脑腹侧被盖区含黑色素的细胞是投射到中脑边缘系统和嗅结节的多巴胺纤维的主要来源，同样，帕金森病情况下中脑皮质和中脑边缘的多巴胺系统显著地遭到了破坏。值得注意的是，虽然前嗅核的损害是帕金森病的一个重要特征，但即使是正常的人群，多巴胺合成的限速酶——酪氨酸合成酶在该处也是缺乏的。尽管一些研究支持帕金森病的嗅觉障碍能够体现多巴胺系统的损害，也仅限于纹状体。且对于纹状体的研究尚无统一的定论，特别是纹状体的尾部。已有研究发现背侧纹状体，杏仁体，海马区DAT活性和嗅觉功能测试的得分之间存在联系，但这种联系是否体现了因果关系也不清楚，不排除ACh或是NE对多巴胺能细胞产生了有害的作用[48~49]。也有研究发现，早期帕金森病患者嗅球内小球周细胞中的酪氨酸羟化酶（TH）阳性细胞数目约是正常对照者的2倍，这就提示了疾病早期出现的嗅觉减退可能与嗅球中的DA代偿性增多有关[50]。但是随着病情的不断进展，代偿性作用消失后，嗅

球中的DA能神经元数量逐渐减少。总而言之，MPTP损伤确实造成了多巴胺能神经元表达的异常。

通过以上的分析和总结，我们可以得出在罹患帕金森病的情况下嗅觉通路的相关脑区存在着多巴胺系统递质的变化，而我们的实验结果也证实：1.嗅球内存在着DA, D1R, D2R, DAT, DARPP32的表达，这就提示嗅球内存在着一个非常复杂的多巴胺通路。2. MPTP损伤造成了嗅球内DA, D1R, D2R, DAT, DARPP32表达不同程度的减少。

我们还选择观察ChAT、5-TH和GABA在嗅球中的表达。乙酰胆碱是最早被确定的一种神经递质，神经系统内以ACh为神经递质的神经元称为胆碱能神经元。ACh自身化学性质很不稳定，在生物组织内释放后又极易被胆碱酯酶水解，这给研究中枢胆碱能神经元的分布及纤维联系带来了很大的困难。由于ChAT是神经元内ACh合成的特异酶，与ACh在中枢神经系统内的分布颇为一致，故而以ChAT为检测目标的免疫组织和细胞化学方法此后得到广泛应用。5-羟色胺与多巴胺同属单胺类神经递质，5-羟色胺的作用广泛，对包括情绪、焦虑、睡眠、体温、食欲、性行为、运动、心血管功能和痛觉等都有调节作用。γ-氨基丁酸是中枢神经系统中的抑制性递质，在控制神经兴奋性与信息加工，神经可塑性与网络同步化等方面起到相当重要的作用[50]。在我们的实验中，通过免疫组化的方法探究这些神经递质在是否在食蟹猴嗅球中有表达及它们的分布情况，还有MPTP损伤对食蟹猴嗅球中各神经递质表达的影响。

我们的实验发现了MPTP损伤后，嗅球中ChAT、5-HT和GABA的表达量下降。我们采用的是食蟹猴MPTP系统性帕金森模型。MPTP是偶然被发现的具有致PD样作用的有毒化合物，以后，发展成为PD实验研究模型。可以认为这是迄今最接近临床发病的PD实验动物模型。MPTP的脂溶性高，容易通过血-脑屏障。在脑内，它可被胶质细胞摄取，经单胺氧化酶-B的催化生成MPDP﹢，再生成MPP﹢。MPP+通过DA转运体被转运到神经元。在神经元内的MPP+又可以通过抑制线粒体功能和氧化应激两条通路诱导DA神经元死亡。MPP﹢选择性地抑制线粒体复合物Ⅰ的活性，影响线粒体电子链的传递与氧化磷酸化，使细胞的能量供给障碍，继发性激活谷

氨酸介导的神经毒机制，使细胞内钙离子的浓度升高，从而使下游细胞损伤信号转导途径激活，导致细胞死亡。此外，在MPP﹢代谢中产生大量的自由基，形成的自由基可催化细胞的氧化应激过程，从而诱导细胞氧化损伤，导致细胞功能障碍和死亡。越来越多的神经递质被发现，机制毒理学也在不断发展，神经毒性的研究领域迅速发展[51~52]。同时，相关的受体及其亚型的知识也日益丰富，我们逐渐认识到，毒性物质对神经递质系统的影响是多方面的：合成或降解酶，突触前囊泡或特化的受体等等。我们考虑MPTP的神经毒性作用造成了食蟹猴嗅球中ChAT、5-HT、GABA表达量的下降。

MPTP损伤对食蟹猴嗅球胶质细胞的影响

神经胶质细胞又称胶质细胞，是神经组织中除神经元外另一大类细胞，其数量为神经元的10~50倍，胶质细胞体通常较小，中枢神经系统的胶质细胞主要包括星形胶质细胞，少突胶质细胞和小胶质细胞。胶质细胞的主要功能包括对神经元支持、分隔绝缘、形成髓鞘、营养，促进神经元的修复和再生，参与神经元的递质传递、代谢，神经系统的发育和神经系统的病理，参与血-脑屏障的形成等。小胶质细胞在中枢神经系统中分布较广，是免疫细胞。小胶质细胞一般处于静息状态，中枢神经系统内任何很小的病理性变化都可激活小胶质细胞，激活的小胶质细胞可能导致神经细胞的死亡，从而进一步加重中枢神经系统的损伤。中枢神经系统中数目最多的一种细胞是星形胶质细胞，它是胶质细胞的主要类别，几乎具有胶质细胞的所有功能。脑损伤或病理因素可以激活星形胶质细胞，激活后星形胶质细胞能生成和释放多种神经递质和神经活性物质，在受体、离子通道、抗原提呈、基因转录等多个方面参与神经疾病的发病过程。

PD患者和长期暴露于MPTP的黑质和纹状体内有胶质增生和反应性小胶质细胞的现象。用MPTP处理后，小鼠黑质有一过性胶质反应以及IL-6增加。在MPTP氧化代谢中胶质细胞起重要作用，包括过氧化物形成，谷氨酸释放，生长因子合成增加等等。鉴于PD发病过程和胶质细胞的关系，我们的实验通过免疫组化的方法观察MPTP损伤是否对嗅球中的胶质细胞产生了影响。我们选用两种抗体：抗Iba1抗体，抗GFAP抗体。Iba1被认为是小胶质细胞的标记蛋白。GFAP被认为是星形

胶质细胞的特征性抗原，用来对星形胶质细胞进行标记。我们的实验观察这两种标记蛋白在嗅球中的分布情况以及MPTP损伤对它们表达情况的影响，以此作为

MPTP损伤对胶质细胞影响的一个反应

传统的观点认为星形胶质细胞的功能是对中枢神经系统结构支持﹑营养和保护。随着研究的深入，对星形胶质细胞的够功能有了进一步的了解。星形胶质细胞是中枢神经系统内主要的胶质细胞。它的功能广泛，包括：在神经系统发育时期引导神经元迁移；修复与再生作用；参与神经系统免疫；参与神经递质的合成与代谢；维持神经系统内环境稳定；参与包括血-脑屏障在内的脑屏障形成；星形胶质细胞具有多种神经递质的受体。小胶质细胞是存在于中枢神经系统的特化的免疫细胞，形成了中枢神经的局部免疫系统。不同的生理或病理情况下，在成年的中枢神经系统可观察到不同形态的小胶质细胞。而当中枢神经系统损伤以后小胶质细胞被激活增殖，形态也发生变化，类似于吞噬细胞样，粗大，此时称为吞噬性小胶质细胞。小胶质细胞除吞噬作用外，它还具有抗原提呈作用，也可作为免疫效应细胞分泌多种细胞因子如IL、TNF等。神经胶质细胞与神经系统疾病密切相关。例如星形胶质细胞含单胺氧化酶B，该酶能把MPTP转变成有毒的MPP﹢，后者可损伤中脑的多巴胺能神经元而引起震颤性麻痹，越来越多的证据显示胶质细胞参与了帕金森病的发病机制。既然PD发病过程存在炎症反应和免疫异常，胶质细胞在其中发挥的作用越来越为人们所重视。在我们的实验中观察到GFAP和Iba1的阳性物质在MPTP损伤后是轻度增加的，这提示MPTP损伤后星形胶质细胞和小胶质细胞可能被一定程度的激活或增殖，而TNF-α表达量上升，提示MPTP损伤造成了炎症反应。

MPTP损伤对食蟹猴嗅球凋亡信号表达的影响

虽然帕金森病的机制尚不明了，神经元的凋亡已被证明涉及其中。细胞凋亡是指细胞在一定的生理或病理条件下遵循自身的程序自己结束生命的过程。由于这种死亡过程是由基因控制的自杀程序活化引起的主动性死亡，因此也称为程序性细胞死亡。一般而言，细胞凋亡是一个形态学概念，细胞凋亡的进程在形态学上可以分为三个阶段，1.凋亡的起始主要表现为细胞表面的特化结构消失，内质

网腔膨胀，并与质膜融合，染色质固缩形成新月形等边集现象，2.凋亡小体的形成，染色质断裂为大小不等的片段，与一些细胞器一起被返折的细胞膜包围，以出泡的方式形成芽状突起，逐渐与细胞分离，形成凋亡小体3。凋亡小体被邻近的细胞吞噬清除。形态学检测是鉴定细胞凋亡最可靠的方法之一，主要是通过光学显微镜，荧光显微镜和电子显微镜对活细胞以及经过化学，荧光或电子染色处理的细胞和组织切片进行形态学观察，根据细胞凋亡时发生的形态学变化特征进行鉴定和区别坏死细胞。

细胞内外的许多信号刺激可以诱导细胞发生凋亡，能诱导细胞凋亡的因素很多，物理性，化学性，病原体，细胞的缺血，缺氧，缺乏生长必需的生长因子或激素，营养耗尽或炎症反应等也可导致细胞凋亡。诱导凋亡的信号虽多种多样，但凋亡的生化特征及死亡通路却相当保守，目前在哺乳动物细胞中了解比较清楚的凋亡信号通路有两条：一条是细胞表面死亡受体介导的细胞信号通路，另一条是以线粒体为核心的细胞凋亡信号通路。除了细胞外部信号分子可以通过与细胞表面相应的死亡受体结合导致细胞凋亡外，细胞内源性信号分子也可以激发细胞凋亡，能通过损伤线粒体而导致细胞凋亡。研究证实，线粒体在细胞凋亡中处于凋亡调控的中心位置，很多Bcl-2家族的蛋白如Bcl-2等都定位于线粒体膜上，Bcl-2通过阻止Cytc从线粒体释放来抑制凋亡，活化的caspase 8，它一方面作用于procaspase 3，另一方面催化Bid裂解成2个片段，其中含BH3结构域的C-端片段被运送到线粒体，引起线粒体内Cytc高效释放，引起线粒体内Cytc高效释放。中枢神经系统不同部位特殊类型神经元的丧失是各种神经退行性疾病的病理特点，细胞凋亡与神经元的丢失密切相关。

细胞凋亡参与神经细胞的发育和老化的生理和病理过程。凋亡可能也参与PD的发病[53]。线粒体膜通透性发生变化时，线粒体释放细胞色素C和凋亡蛋白，这两种作用的结果均可能诱导细胞内的凋亡信号转导分子的活化，从而引起神经细胞的凋亡。人们研究观察到，MPP﹢在体外可以诱导多种细胞株的凋亡。小鼠用MPTP处理后，黑质出现DNA片段化。MPTP处理后小鼠黑质bax mRNA及其蛋白增加，而Bcl-2和BclXL蛋白减少；而神经元表达Bcl-2或Bax缺陷的动物均可以抵抗MPTP

的神经毒性。阻断线粒体孔开放的药物可减弱MPP+诱导的凋亡，而使之保持开放的药物则增强MPP+的凋亡作用。MPTP处理后，小鼠黑质出现细胞色素C激活caspase，使caspase活性升高。另外，caspase抑制可降低MPTP的神经毒性。在体外用antisense阻断caspase蛋白合成后可阻止凋亡。以上证据均表明线粒体依赖的caspase凋亡通路参与PD的发病。近年来的研究表明，线粒体功能异常与

PD的发病密切相关。例如全身使用线粒体复合体Ⅰ抑制剂鱼藤酮可以选择性的引起黑质多巴胺能神经元丢失以及Lewy小体的形成。在PD的黑质内，线粒体电子传递链的复合体活性降低，并与辅酶Q10水平变化相平行。线粒体复合体Ⅰ被抑制可以导致线粒体的耗氧量增加，从而导致氧化加强，自由基产生增加，后者导致氧化应激损伤加剧，引起细胞死亡。而MPP﹢选择性的抑制线粒体复合物Ⅰ的活性，这也是MPTP作为PD实验研究模型的基础。

这里我们以免疫组化SABC染色法来观察MPTP组的嗅球切片是否存在凋亡的异常。实验结果示MPTP组Bcl2表达量下降，而caspase3表达量上升，提示MPTP损伤后，食蟹猴嗅球中细胞凋亡增多，这可能促进了帕金森病的进程。

结论：

1. MPTP系统性食蟹猴帕金森病模型的建立：采用小剂量连续给药方法，即0.2mg/kg MPTP-HCl溶液，于下肢静脉缓慢注入，每天早晨1次（9AM）。采用个体化原则，以出现典型的临床症状为注射终点。临床评分参见Kurlan（1991）帕金森评分量表。注射MPTP后10～14（12.0±1.67）天，临床评分达到10(10.5±0.55)分，在其后约1周的时间（开始注射MPTP后18.8±2.9天）临床症状持续进展并进入相对稳定期，此时临床评分为（19.5±4.8）分。食蟹猴系统性帕金森病模型建立成功。证明MPTP的剂量、给药方法有效，临床症状的进程也可供参考。

2.食蟹猴嗅球神经递质分布：食蟹猴嗅球内存在单胺类神经递质DA、5-HT和氨基酸类神经递质ChAT、GABA的表达。DA能神经元和5-HT能神经元分布于嗅球各层，纤维分布广，遍及整个嗅球。GABA能神经元和纤维分布于嗅球各层，ChAT阳性细胞分布于突触小球，D1R阳性神经元见于突触小球层，D2R阳性神经元和DAT阳性细胞见于嗅球各层。DARPP32阳性细胞见于突触小球层和颗粒细胞层。

3. 食蟹猴嗅球胶质细胞的分布：Iba1阳性细胞主要见于突触小球层和外网状层，

GFAP阳性细胞各层均可见。

4. MPTP损伤对食蟹猴嗅球神经递质的影响：MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球内单胺类神经递质表达的减少。MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球内氨基酸类神经递质表达的减少。MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球D1R、D2R、DARPP32、DAT表达的减少。

5. MPTP损伤对食蟹猴嗅球胶质细胞的影响：MPTP损伤刺激了食蟹猴嗅球内胶质细胞的增生反应。

6. MPTP损伤对食蟹猴嗅球凋亡标志物的影响MPTP损伤造成了食蟹猴嗅球Bcl2表达量的下降和caspase3表达量的上升。提示MPTP损伤引起食蟹猴嗅球内细胞凋亡的异常，呈上升。

# 创新点

1.现有的文献资料已完善了大鼠、小鼠、帕金森病患者、正常健康人群的细胞和纤维的分布，但它们都是嗅觉发达的动物。作为嗅觉不发达动物的非人灵长类食蟹猴的资料相对较少。

2.我们检测的神经递质和重要功能蛋白较多，从而能够较为全面的反映出食蟹猴嗅球的组织结构形态以及神经递质及重要蛋白在食蟹猴嗅球中的分布和表达情况。

# 进一步研究方向

1.丰富实验方法，在已有实验知识的基础上，有选择的研究某种或某几种递质和功能蛋白。可以结合动物实验的行为学研究，试图找到嗅觉障碍和某种或某几种递质或蛋白表达异常的相互关联。

2.目前对于帕金森病的研究趋于免疫异常的机制，这就使得胶质细胞成为关注的热点。下一步的研究可以重点放在胶质细胞的研究上。如星形胶质细胞作为中枢

神经系统中的抗原提呈细胞，参与了神经系统的免疫应答，其中一种参与的方式是分泌多种细胞因子。我们可以试图找到这些细胞因子，证明它们与疾病进程之间的某种联系。

3.已有研究证明星形胶质细胞也有多种神经递质的受体，我们对于中枢神经系统的神经通路研究，也扩展到神经元与胶质细胞之间的联系。突破了传统的胶质细胞只起结构支持和营养作用的认知，我们对胶质细胞的功能需要更多的知识，我们下一步的研究可以把方向锚定在胶质细胞，通过现有的实验技术观察它在疾病进程中的各方面的变化，为进一步阐释疾病的机制奠定基础。

参考文献

[1] Doty R L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. Neurobiology of disease, 2012, 46(3): 527-552.

[2] Wallace V C J, Chaudhuri K. Unexplained lower limb pain in Parkinson's disease: A phenotypic variant of" painful Parkinson's disease"[J]. Parkinsonism & related disorders, 2013.

[3] Neikrug AB. Effects of sleep disorders on the non-motor symptoms of Parkinson disease. J Clin Sleep Med, 2013, Nov 15; 9(11): 1119-29.

[4] Brodoehl S, Klingner C, Volk G F, et al. Decreased olfactory bulb volume in idiopathic Parkinson's disease detected by 3.0‐Tesla magnetic resonance imaging Movement Disorders, 2012, 27(8): 1019-1025.

[5] Haehner A, Boesveldt S, Berendse H W. et a1. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease- a multicenter study. Parkinsonism Relat Disord, 2009, 15(7): 490-494.

[6] Tissingh G, Berendse HW, Bergmans P, et al. Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. Mov Disord. 2001; 16(1): 41-6.

[7] Doty R L, Shaman P, Dann M. Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function[J]. Physiology & Behavior, 1984, 32(3): 489-502.

[8] Doty R L, Frye R E, Agrawal U. Internal consistency reliability of the fractionated and whole University of Pennsylvania Smell Identification Test[J]. Perception & Psychophysics, 1989, 45(5): 381-384.

[9] Doty R L, Shaman P, Dann M. Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function[J]. Physiology & Behavior, 1984, 32(3): 489-502.

[10] Haehner A, Hummel T, Hummel C, et al. Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease[J]. Movement disorders, 2007, 22(6): 839-842.

[11] Double K L, Rowe D B, Hayes M, et al. Identifying the pattern of olfactory deficits in Parkinson disease using the brief smell identification test[J]. Archives of Neurology, 2003, 60(4): 545-549. [12] Montgomery E B, Baker K B, Lyons K, et al. Abnormal performance on the PD test battery by asymptomatic first-degree relatives[J]. Neurology, 1999, 52(4): 757-757.

[13] Herting B, Bietenbeck S, Scholz K, et al. [Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: its role as a new cardinal sign in early and differential diagnosis] [J]. Der Nervenarzt, 2008, 79(2): 175-184. [14] Correia Guedes L, Ferreira J J, Rosa M M, et al. Worldwide frequency of G2019S LRRK2 mutation in Parkinson's disease: a systematic review[J]. Parkinsonism & related disorders, 2010, 16(4): 237-242.

[15] Saunders-Pullman R, Stanley K, Wang C, et al. Olfactory dysfunction in LRRK2 G2019S mutation carriers[J]. Neurology, 2011, 77(4): 319-324.

[16] Del Tredici K, Rüb U, de Vos R A I, et al. Where does parkinson disease pathology begin in the brain[J]. JournalofNeuropathology&ExperimentalNeurology, 2002, 61(5): 413-426. [17] MackninJB, HiguchiM, LeeVMY, etal. Olfactorydysfunctionoccursintransgenicmiceoverexpressinghumanτprotein[J]. Brainresearch, 2004, 1000(1): 174-178.

[18] Lei P, Ayton S, Finkelstein D I, et al. Tau protein: relevance to Parkinson's disease[J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2010, 42(11): 1775-1778.

[19] Höglinger G U, Rizk P, Muriel M P, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease[J]. Nature neuroscience, 2004, 7(7): 726-735.

[20] Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, et al. Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb[J]. Experimental neurology, 2006, 197(1): 113-121. [21] Priyadarshi A, Khuder S A, Schaub E A, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis[J]. Environmental research, 2001, 86(2): 122-127.

[22] Bloem B R, Irwin I, Buruma O J S, et al. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease[J]. Journal of the neurological sciences, 1990, 97(2): 273-293.

[23] William Langston J. MPTP and Parkinson's disease[J]. Trends in Neurosciences, 1985, 8: 79-83. [24] Scalia F, Winans S S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals[J]. Journal of Comparative Neurology, 1975, 161(1): 31-55.

[25] Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information[J]. Science, 1999, 286(5440): 711-715.

[26] Ansari K A, Johnson A. Olfactory function in patients with Parkinson's disease[J]. Journal of chronic diseases, 1975, 28(9): 493-497.

[27] Ward C D, Hess W A, Calne D B. Olfactory impairment in Parkinson's disease[J]. Neurology, 1983, 33(7): 943-943.

[28] Hawkes C H, Shephard B C, Daniel S E. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease[J]. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1997, 62(5): 436-446.

[29] SERBY M, CORWIN J, CONRAD P, et al. Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. American Journal of Psychiatry, 1985, 142(6): 781-a-782.

[30] Mesholam R I, Moberg P J, Mahr R N, et al. Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. Archives of neurology, 1998, 55(1): 84-90.

[31] Doty R L, Agrawal U. The shelf life of the University of Pennsylvania smell identification test (UPSIT)[J]. The Laryngoscope, 1989, 99(4): 402-404.

[32] Doty R L, Shaman P, Kimmelman C P, et al. University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic[J]. The Laryngoscope, 1984, 94(2): 176-178.

[33] Persaud K, Dodd G. Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose[J]. 1982.

[34] Shipley M T, Ennis M. Functional organization of olfactory system[J]. Journal of neurobiology, 1996, 30(1): 123-176.

[35] Allison A C. The morphology of the olfactory system in the vertebrates[J]. Biological Reviews, 1953, 28(2): 195-244.

[36] Scalia F, Winans S S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals[J]. Journal of Comparative Neurology, 1975, 161(1): 31-55.

[37] Shepherd G M. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb[J]. Physiological Reviews, 1972, 52(4): 864-917.

[38] Esiri M M, Wilcock G K. The olfactory bulbs in Alzheimer's disease[J]. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1984, 47(1): 56-60.

[39] Przedborski S, Jackson-Lewis V. Mechanisms of MPTP toxicity[J]. Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, 1997, 13: 35-38.

[40] Kopin I J, Markey S P. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease[J]. Annual review of neuroscience, 1988, 11(1): 81-96.

[41] Ovadia A, Zhang Z, Gash D M. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys[J]. Neurobiology of aging, 1995, 16(6): 931-937.

[42] Hsia A Y, Vincent J D, Lledo P M. Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb[J]. Journal of Neurophysiology, 1999, 82(2): 1082-1085.

[43] Kebabian J W, Calne D B. Multiple receptors for dopamine[J]. 1979.

[44] Hemmings H C, Greengard P, Tung H Y L, et al. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1[J]. 1984.

[45] Greengard P, Allen P B, Nairn A C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade[J]. Neuron, 1999, 23(3): 435-447.

[46] Toresson H, Campbell K. A role for Gsh1 in the developing striatum and olfactory bulb of Gsh2 mutant mice[J]. Development, 2001, 128(23): 4769-4780.

[47] Doty R L, Risser J M. Influence of the D-2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rats before and after spiperone administration[J]. Psychopharmacology, 1989, 98(3): 310-315.

[48] Kish S J, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease[J]. New England Journal of Medicine, 1988, 318(14): 876-880.

[49] Wilson J M, Kalasinsky K S, Levey A I, et al. Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users[J]. Nature medicine, 1996, 2(6): 699-703.

[50] Huisman E, Uylings H, Hoogland P V. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease[J]. Movement Disorders, 2004, 19(6): 687-692. [51] Trombley P Q, Shepherd G M. Synaptic transmission and modulation in the olfactory bulb[J]. Current opinion in neurobiology, 1993, 3(4): 540-547.

[52] Wesemann W, Grote C, Clement H W, et al. Functional studies on monoaminergic transmitter release in parkinsonism[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 1993, 17(3): 487-499.

[53] Nicotra A, Parvez S H. Apoptotic molecules and MPTP-induced cell death[J]. Neurotoxicology and teratology, 2002, 24(5): 599-605.

[54] Smeyne M, Jiao Y, Shepherd K R, et al. Glia cell number modulates sensitivity to MPTP in mice[J]. Glia, 2005, 52(2): 144-152.

附 录

本人简历

程炜，男，1979年06月生，池州市

1994.9-1997.7贵池中学学生

1997.9-2002.7安徽医科大学临床医学本科

2002.7-2010.5池州市人民医院医师

2011.9-2014安徽医科大学神经生物学硕士在校发表学术论文情况

程炜，任振华，李光武等，

《MPTP对食蟹猴嗅球多巴胺能神经元的影响》（解剖学报）

致 谢

感谢李光武老师三年来对我的关怀，在此谨向我的导师致以衷心的感谢和真挚的敬意。

十分感念任振华老师成为了我科研上的启蒙。感谢徐胜春，徐金勇老师。

感谢蔡函，许慧等同学。感激父母。

# 综述

帕金森病嗅觉障碍之研究进展

前 言

传统的对帕金森病的认识限于运动功能障碍，而帕金森病患者的非运动症状如抑郁，睡眠障碍，嗅觉功能障碍也越来越引起人们的关注[1~3]。帕金森病并发嗅觉障碍发病率极高，临床研究表明，帕金森病患者嗅觉功能障碍是疾病的征兆[1]，并且常常早于运动症状数月甚至数年[4]。这些研究成果启发人们对于帕金森病发病机制的探究可以从嗅觉系统入手，从而找到治疗疾病的有效途径。

帕金森病（Parkinson's disease, PD）是一种常见的神经系统变性疾病，平均发病年龄为60岁左右，很少有40岁以下起病的青年帕金森病患者。帕金森病的主要症状是静止性震颤，运动迟缓，姿势步态障碍，行走时上肢协同摆动动作消失，四肢、颈部、面部的肌肉发硬。大部分帕金森病患者为散发病例，仅有不到10%的患者有家族史。目前对帕金森病的诊断，主要还是依靠临床的诊断。近年来，越来越多的研究发现PD患者除了运动症状外，还表现出一系列非运动症状，如睡眠障碍、嗅觉障碍、焦虑、抑郁、自主神经功能障碍等。其中嗅觉功能障碍往往发生较早，其发生率超过了静止性震颤这一特征性症状。

1975年，Ansari等首次报道了22例男性帕金森病患者他们的嗅觉阈值明显的高于正常对照组，并提出了嗅觉异常与帕金森病的进展速度相关的观点[5]。最近一项多中心的研究结果显示嗅觉障碍与帕金森病的疾病分级有关。大量的研究表明，嗅觉障碍即可出现在帕金森病的临床前期，也可以出现于PD的病程中，嗅觉障碍与帕金森病密不可分。

嗅觉系统的解剖和生理

嗅觉系统由嗅黏膜与嗅球，嗅皮层组成。嗅黏膜包括嗅上皮和固有层，嗅球位于颅前窝底部嗅沟腹侧面，为分层结构。嗅球中僧帽细胞、丛状细胞的轴突纤维与嗅皮质投射到嗅球颗粒细胞的纤维、对侧嗅球与前嗅核的传出纤维等一同构成嗅束。嗅皮质是嗅觉的高级皮质中枢，包括前梨状区和杏仁核周区、内嗅区，

接受嗅球和前嗅核等的纤维传入，并投射至海马。内嗅区作为联络皮质，对嗅觉冲动与其他冲动进入海马起到整合的作用[6]。

嗅觉障碍的检测

妨碍人们认识帕金森病嗅觉障碍的原因有两个，其一，超过80%的帕金森病人并没有完全丧失嗅觉，因为没有引起明显的生活质量下降而失察，Hawkes和

Shephard使用宾夕法尼亚大学嗅觉诊断测试对大量的帕金森病患者进行测试，发现帕金森病病人的嗅觉减退对于不同的气味是有选择性的。帕金森病病人对浓烈的洋葱等气味与健康的人没有明显的感知差别，但是对于冬青油等气味感知能力明显下降。其二，嗅觉诊断的手段有待提高。嗅觉受主观影响颇大，精确的测定非常困难。目前用于检测嗅觉的方法有两大类：主观的检查方法如标准微胶囊嗅功能检查，客观的检查方法OEPs嗅电图[7]。宾西法利亚大学研发的嗅觉诊断试纸推广以来，帕金森病的嗅觉障碍也正式被记录在文献。越来越多的研究者意识到，帕金森病的嗅觉障碍不仅改变了人们对于帕金森病传统的认知，也提示我们可以通过对疾病进程的探究从而找到治疗帕金森病的有效手段。

PD动物模型

最早PD动物模型的制成是人们通过给啮齿类动物腹腔注射利血平发现动物产生类似于人类帕金森病的症状[8]。之后也探索出其他众多的帕金森病动物模型。模型建立的标准主要是模拟运动障碍的相似程度及动物脑部的生化及病理改变。20世纪80年代有研究发现通过静脉给予1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢嘧啶（MPTP）后能够造成与帕金森病类似的症状，且从临床症状来说，MPTP诱导的帕金森病极似自发性帕金森病，目前最为理想的帕金森病动物模型是MPTP食蟹猴帕金森病模型。该模型的临床症状，病理变化，生化改变非常稳定，很适合研究帕金森病的机制[9, 10]。

帕金森病嗅觉障碍可能的病因遗传因素

家族性帕金森病表现为震颤、肌张力、嗅觉障碍。家族性帕金森病遗传方式是常染色体显性遗传，目前发现的致病基因包括G2019S、Y1699C、R1941H和

T23561[11]. 不同的基因突变对嗅觉功能产生不同的影响，遗传因素很可能是影响

PD嗅觉障碍的重要因素。异常蛋白

帕金森病的一大重要病理特征是在发生了退行性变的神经元中出现了以α

-synuclein为主要成分的包涵体以及Tau蛋白相关的神经纤维的聚集[12, 13]。研究也发现在发生嗅觉障碍的帕金森病患者中杏仁体、嗅皮质、嗅球也同样有这样的情况，但在嗅上皮中未见Tau蛋白相关的神经纤维的聚集，提示帕金森病嗅觉障碍的产生可能与中枢的嗅觉通路异常蛋白聚集有关。

神经通路的异常

嗅觉系统存在着极其复杂的神经通路。而对神经通路的研究离不开神经递质的研究。这些神经递质的异常往往早于PD的病理改变，甚至是促进PD病理进展的因素。研究发现多巴胺耗竭导致了啮齿类动物气味鉴别能力的下降，多巴胺转运体基因敲除的小鼠有气味辨别能力的缺陷[14]。越来越多的研究也发现在嗅觉相关的脑区有其他递质的变化，但是这些递质的改变从多大程度上影响到嗅觉功能尚无可知，尤其是这些递质间的相互作用使得我们更加的难以把嗅觉障碍与某一种或某几种的递质的改变联系起来[15, 16, 17]。

环境因素

金属离子、病毒等危险因子通过嗅上皮直接通过大脑，产生炎症反应，嗅觉通路上的某些改变可能产生帕金森病的嗅觉障碍[18]。

总结帕金森病作为中枢神经系统常见的退行性变，发病机制同样涉及到炎症反应和免疫反应[19,20,21,22]，因此对于炎性因子和免疫因素的研究越来越广泛，旨在揭示出帕金森病的发病机制，从而找到根治帕金森病的新的靶点。帕金森病嗅觉障碍因出现在病程的早期或前期且更为普遍，高度提示我们对帕金森病嗅觉障碍的深入研究更有利于探究帕金森病的机制。现有的研究已经从异常蛋白、神经递质、遗传因素、环境因素等诸多方面积累了相关的知识，为以后的深入研究奠定基础。

参考文献：

[1] Doty R L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. Neurobiology of disease, 2012, 46(3): 527-552.

[2] Wallace V C J, Chaudhuri K. Unexplained lower limb pain in Parkinson's disease: A phenotypic variant of" painful Parkinson's disease"[J]. Parkinsonism & related disorders, 2013.

[3] Neikrug AB. Effects of sleep disorders on the non-motor symptoms of Parkinson disease. J Clin Sleep Med,2013, Nov 15;9(11):1119-29.

[4] Brodoehl S, Klingner C, Volk G F, et al. Decreased olfactory bulb volume in idiopathic Parkinson's disease detected by 3.0‐Tesla magnetic resonance imaging Movement Disorders, 2012, 27(8): 1019-1025.

[5] Ansari K A, Johnson A. Olfactory function in patients with Parkinson's disease[J]. Journal of chronic diseases, 1975, 28(9): 493-497.

**[6] Brunjes P C, Frazier L L. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates[J]. Brain Research Reviews, 1986, 11(1): 1-45.**

[7] Eibenstein A, Fioretti A B, Lena C, et al. Modern psychophysical tests to assess olfactory function[J]. Neurological Sciences, 2005, 26(3): 147-155.

[8] Carlson N J, Doyle G A, Bidder T G. The effects of dl-amphetamine and reserpine on runway performance[J]. Psychopharmacologia, 1965, 8(3): 157-173.

[9] Przedborski S, Jackson-Lewis V. Mechanisms of MPTP toxicity[J]. Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, 1997, 13: 35-38.

[10] Forno L S, DeLanney L E, Irwin I, et al. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonsim and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations[J]. Advances in neurology, 1992, 60: 600-608

[11] Saunders-Pullman R, Stanley K, Wang C, et al. Olfactory dysfunction in LRRK2 G2019S mutation carriers[J]. Neurology, 2011, 77(4): 319-324.

[12] Goris A, Williams‐Gray C H, Clark G R, et al. Tau andα‐synuclein in susceptibility to, and

Dementia in, Parkinson's disease[J]. Annals of neurology, 2007, 62(2): 145-153.

[13] Lei P, Ayton S, Finkelstein D I, et al. Tau protein: relevance to Parkinson's disease[J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2010, 42(11): 1775-1778

[14[14]]Taylor T N, Caudle W M, Shepherd K R, et al. Nonmotor symptoms of Parkinson's disease

Revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity[J]. The Journal of neuroscience, 2009, 29(25): 8103-8113.

[15] Spina M B, Cohen G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989, 86(4): 1398-1400. [16]Hartmann J, Künig G, Riederer P. Involvement of transmitter systems in neuropsychiatric diseases[J]. Acta neurologica Scandinavica. Supplementum, 1992, 146: 18-21.

[17] Nordberg A, Nyberg P, Windblad B. Topographic distribution of choline acetyltransferase activity and muscarinic and nicotinic receptors in Parkinson brains[J]. Neurochemical pathology, 1984, 3(4): 223-236.

[18] Liou H H, Tsai M C, Chen C J, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease A case

‐control study in Taiwan[J]. Neurology, 1997, 48(6): 1583-1588.

[19] Hirsch E C, Hunot S, Damier P, et al. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration[J]. Annalsofneurology, 1998, 44(3Suppl1): S115-20.

[20] McGeer P L, McGeer E G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism & related disorders, 2004, 10: S3-S7.

[21] Hirsch E C, Breidert T, Rousselet E, et al. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2003, 991(1): 214-228.

[22] Teismann P, Schulz J B. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation[J]. Cell and tissue research, 2004, 318(1): 149-161.