

## · 论著 ·

# 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶制备的帕金森病模型小鼠对帕金森病自主神经功能障碍的适用性研究

汪烨，姜雯雯，吴晶，程越，张克忠

**【摘要】目的** 探讨 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的帕金森病(PD)小鼠模型对 PD 自主神经功能障碍研究的适用性。**方法** 将 20 只 2 月龄小鼠随机分为 MPTP 组和对照组,每组 10 只。MPTP 组皮下注射 MPTP(20 mg/kg)联合腹腔注射丙磺舒(250 mg/kg),每周 2 次,连续 5 周;对照组注射相同剂量、频次的生理盐水及丙磺舒溶液。于第 2,3,4,5,6 周评估小鼠自主神经功能(胃肠功能、泌尿功能、心血管功能),同时采用转棒、爬竿测试评价小鼠的运动功能。采用免疫组化法测量中脑黑质阳性多巴胺能神经元的数量,Western blotting 法检测酪氨酸羟化酶(TH)的表达。**结果** 与对照组相比,MPTP 组第 4~6 周排便颗粒数显著减少,第 5~6 周粪便含水量显著降低( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。与对照组相比,MPTP 组第 5~6 周 1 h 排尿次数显著增多,平均单次尿量显著下降(均  $P < 0.01$ )。两组小鼠各时间点心率及连续 RR 间隔差的均方根(RMSSD)差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。两组小鼠第 2~5 周运动功能差异无统计学意义,第 6 周 MPTP 组小鼠转头时间及爬杆时间显著延长,而转棒时间显著减少(均  $P < 0.05$ )。MPTP 组小鼠黑质区域多巴胺能神经元数量及中脑 TH 表达均显著降低( $t = 19.00, P < 0.001$ ;  $t = 3.67, P < 0.01$ )。MPTP 组小鼠中脑多巴胺能神经元数量与排便颗粒数、粪便含水量以及平均单次尿量呈正相关( $r = 0.6930, P < 0.05$ ;  $r = 0.6718, P < 0.05$ ;  $r = 0.8149, P < 0.05$ ),与 1 h 排尿次数呈负相关( $r = -0.7155, P < 0.05$ )。**结论** 慢性 MPTP 诱导的小鼠模型可用于 PD 早期胃肠道功能及泌尿系统功能的研究,但不适用于心血管功能的研究。

**【关键词】** 帕金森病；1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶；帕金森病动物模型；自主神经功能障碍

**【中图分类号】** R742.5      **【文献标识码】** A      **【文章编号】** 1004-1648(2022)01-0049-07

**Applicability research of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-prepared mouse model for autonomic nervous dysfunction in Parkinson's disease** WANG Ye, JIANG Wen-wen, WU Jing, et al.  
Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the applicability of mouse model of Parkinson's disease (PD) induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on study of autonomic nervous dysfunction in PD. **Methods** A total of twenty 2-month-old mice were randomly divided into control and model groups with 10 in each group. For MPTP group, MPTP (20 mg/kg) was administrated subcutaneously combining with an intraperitoneal injection of probenecid (250 mg/kg) twice a week for 5 weeks, while the control group was injected with physiological saline and probenecid at the same dose and frequency. The autonomic nerve function (gastrointestinal, urinary and cardiovascular function) of mice at week 2, 3, 4, 5, 6 were assessed, and the rotating rod and climbing pole test were used to evaluate the motor function of mice at the same time. The immunohistochemical method was employed to measure the number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons in the substantia nigra of the midbrain, while Western blotting was used to examine the expression of TH. **Results** Compared with those in control group, the number of defecation particles in the MPTP group were reduced significantly at weeks 4~6, and the fecal water content was decreased remarkably at weeks 5~6 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ). Compared with those in control group, MPTP group exhibited a significant increase in number of 1 hour urination and a remarkable decrease in average single urination volume at weeks 5~6 (all  $P < 0.01$ ). There were no significant differences in heart rate and root mean square of successive RR interval difference (RMSSD) between the two groups at each time point (all  $P > 0.05$ ). The motor function of the two groups had no statistical difference at weeks 2~5. The head turning time and pole-climbing time in MPTP group elevated significantly at week 6, while the time in the rotarod was declined significantly (all  $P <$

基金项目：国家自然科学基金面上项目(82071431)

作者单位：210029 南京医科大学第一附属医院神经内科

通信作者：张克忠

0.05)。Number of dopaminergic neurons in substantia nigra and the expression of TH in midbrain were both significantly decreased in MPTP group ( $t = 19.00, P < 0.001$ ;  $t = 3.67, P < 0.01$ )。The number of dopaminergic neurons in the substantia nigra of MPTP group was positively correlated with the number of defecation particles, fecal water content and average single urination volume ( $r = 0.6930, P < 0.05$ ;  $r = 0.6718, P < 0.05$ ;  $r = 0.8149, P < 0.05$ ) , while negatively correlated with the number of 1 hour urination ( $r = -0.7155, P < 0.05$ )。Conclusion Chronic MPTP-induced mouse model can be used to study gastrointestinal and urinary system functions in the early stages of PD, but not cardiovascular function。

**Key words:** Parkinson's disease; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Parkinson's disease mouse model; autonomic nerve dysfunction

帕金森病(PD)是继 Alzheimer's 病后最常见的神经退行性疾病。PD 患者黑质致密部(SNpc)中多巴胺能神经元死亡,基底神经节内多巴胺缺乏导致经典运动障碍,包括运动迟缓、肌强直、静止性震颤以及姿势和步态障碍<sup>[1]</sup>。随着对 PD 研究的不断深入,认知功能障碍、焦虑抑郁、感觉障碍、自主神经功能障碍等非运动症状越来越受到重视。自主神经系统功能障碍是一种常见且重要的非运动症状,且有证据<sup>[2]</sup>表明,PD 患者运动功能障碍出现前几年甚至几十年可能就存在自主神经功能障碍,其形式不一,涉及多个系统及器官,以胃肠功能、膀胱功能、心血管功能障碍多见。有研究<sup>[3]</sup>发现,自主神经功能障碍出现越早,疾病进展越快,患者的生存期越短。目前关于 PD 自主神经功能障碍的机制研究较少,且缺乏经典实验模型。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)小鼠 PD 模型能够模拟 PD 的病理表现,被广泛用于 PD 运动功能障碍研究<sup>[4]</sup>。本文通过评估 MPTP 小鼠模型不同时程各内脏系统的自主神经功能变化,探讨 MPTP 小鼠模型在 PD 自主神经功能障碍机制研究中的适用性,为 PD 自主神经功能障碍研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 2 月龄 SPF 级野生型(WT)雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,质量 24~29 g,购自南京医科大学医药实验动物中心。

1.1.2 常用试剂与仪器 MPTP(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),丙磺舒(#57-66-9,济南尚圣化工有限公司),二甲基亚砜(DMSO,30072418,国药集团化学试剂有限公司),生理盐水,鼠抗酪氨酸羟化酶多克隆抗体(TH,T1299,Sigma-Aldrich),过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(33201ES60,上海翊圣生物科技有限公司),DAB 显色液(江苏凯基生物技术股份有限公司)。PowerLab 26T 多导生理记录仪,分离代谢笼,JLBehv-RRTG-5 通用转棒实验分析系统(上海吉量软件科技有限公司),Leica CM 950 冰冻切片机,Bio-Rad 仪器,Tanon 5200 自动化学发光成像分析系

统,蔡司 AXIO 显微镜。

### 1.2 方法

1.2.1 慢性 PD 小鼠模型的制备及实验设计 将 20 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组( $n = 10$ )和 MPTP 组( $n = 10$ ),所有动物在造模前先适应 1 周。对照组皮下注射无菌生理盐水 0.1 ml/10 g,1 h 后腹腔注射以 DMSO 溶解浓度为 250 mg/ml 的丙磺舒溶液 10  $\mu$ l/10 g;MPTP 组皮下注射浓度为 2 mg/ml 的 MPTP 生理盐水溶液 0.1 ml/10 g,1 h 后腹腔注射丙磺舒溶液 10  $\mu$ l/10 g。注射频率均为 2 次/周,持续 5 周<sup>[5]</sup>。在造模期不同时间行胃肠功能、泌尿功能、心血管功能及运动功能评估,造模结束后取材进行病理学评估,具体实验流程见图 1。所有实验步骤及处理均通过南京医科大学动物保护与伦理委员会批准。

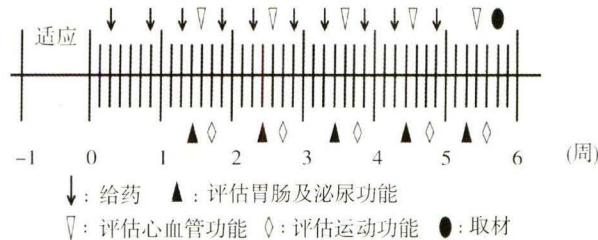


图 1 实验流程图

1.2.2 胃肠功能评估 于第 2~6 周记录小鼠的 1 h 排便颗粒数及粪便含水量。小鼠禁食过夜,在测试前 2 h 给予充足食物。将小鼠放在干净的分离代谢笼中 1 h,收集粪便,计数并称重,经 65 ℃ 烘干过夜再次称重。粪便含水量 = (粪便湿重 - 粪便干重)/粪便湿重 × 100%<sup>[6]</sup>。

1.2.3 泌尿功能评估 于第 2~6 周评估小鼠的泌尿功能。在清洁干燥的桌面上放好滤纸,用 2 000 ml 的烧杯将小鼠扣在滤纸上,持续 1 h。在小鼠排尿滤纸充分吸收尿液后更换滤纸,并标记好尿液湿润的面积,同时记录 1 h 内小鼠排尿次数。滤纸风干 48 h 后剪下标记好的部分,称重。将 0.05 ml、0.10 ml、0.15 ml、0.20 ml、0.25 ml、0.30 ml、0.35 ml、0.40 ml 的生理盐水分别滴在滤纸上,标记浸润的面积,待 48 h 风干后剪下称重,并计算盐水体积与滤纸干重的线性方程[ 小鼠平均单次排尿量(ml) = 0.8088 × 吸收尿液

的滤纸平均干重 - 0.0036], 其中相关系数  $r = 0.9994^{[7]}$ 。

**1.2.4 心血管功能评估** 腹腔注射 4% 水合氯醛 (0.1 ml/10 g) 麻醉小鼠, 通过保温垫将体温维持在 37 °C, 使用生物电势电极监测 ECG, 使用 powerlab 26T 数据采集系统收集图像。截取基线平稳持续 3 min 的 ECG 图像, 通过 labchart 软件分析小鼠心率及心率变异性。在时域中以连续 RR 间隔差的均方根 (RMSSD) ( $\text{ms}^2$ ) 表示的自主性指标进行测量。

**1.2.5 运动功能评估** (1) 转棒测试: 于第 2 ~ 6 周采用转棒实验评估 MPTP 组运动协调能力。将小鼠放于仪器的转动滚筒上, 转轴可加速。仪器自动记录小鼠在转棒上的停留时间, 参数: 低速 ≥ 5 r/min, 高速 ≤ 25 r/min; 加速时间 2 min, 持续时间 5 min。每只小鼠进行 3 次测试, 结果取平均值。(2) 爬竿测试: 于第 2 ~ 6 周采用爬竿测试检测小鼠的运动能力。制作一根直径 1.2 cm、高 50 cm 的直爬杆, 顶部有一外面覆盖纱布的木球。将小鼠头部向上放置于杆顶端, 记录转头时间(从开始运动到完全转为头向下的时间)及爬竿时间(转头后向下爬并到达底端的时间)。每只小鼠检测 3 次, 取最短时间记录。每次测量前用酒精消毒去除残留气味, 以免影响结果。

**1.2.6 中脑黑质多巴胺能神经元的检测** 运动功能及自主神经功能检测结束后, 对黑质区域行 TH 免疫组化染色。采用 4% 的水合氯醛进行麻醉, 行心脏灌注, 取脑后固定并脱水, 将厚度 20 μm 的冰冻中脑切片放置 PBS 中清洗 3 次, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活, 5% BSA 封闭, 一抗过夜, 二抗室温敷育 2 h, DAB 显色液显色, 过梯度乙醇、二甲苯脱水, 中性树胶封片。每只小鼠选 5 张部位一致的中脑切片进行观察, 高倍镜下随机选取 5 个视野进行阳性细胞计数。计算平均值后, 将两组数据进行归一化比较, 以对照组作为阴性对照。

**1.2.7 小鼠 TH 表达的检测** 采用 Western blotting

法检测小鼠中脑的 TH 表达。取小鼠的中脑黑质称重, 加入 RIPA 裂解液, 冰上超声匀浆后裂解 30 min, 以 16 000 g 在 4 °C 离心机中离心分离 15 min, 收集上层透明液体于 EP 管中。用 BCA 方法测蛋白浓度。将蛋白样品加入提前制好的凝胶中, 通过电泳、电转将蛋白转到 PVDF 膜上, 再经封闭、敷一抗、二抗、漂洗。用显色液发光检测, 自动化学发光成像分析系统显影, 应用 Image J 软件分析条带灰度值, 以待测目的蛋白与内参蛋白的灰度值之比表示蛋白的相对表达量。

**1.2.8 统计学方法** 应用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析。计量资料均采用均数 ± 标准误 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验。采用 Pearson 相关分析 MPTP 组模型小鼠脑内多巴胺能神经元水平与胃肠功能、泌尿功能评估结果之间的相关性。

## 2 结 果

**2.1 对照组与 MPTP 组胃肠功能的比较** 见表 1。与对照组相比, MPTP 组第 4 ~ 6 周排便颗粒数显著减少 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ), 第 5 ~ 6 周粪便含水量显著降低 (均  $P < 0.05$ )。

**2.2 对照组与 MPTP 组泌尿功能的比较** 见表 2。与对照组相比, MPTP 组第 5 ~ 6 周 1 h 排尿次数显著增多 (均  $P < 0.01$ ), 平均单次尿量显著下降 (均  $P < 0.01$ )。

**2.3 对照组与 MPTP 组小鼠心率变异性的比较** 见表 3。与对照组相比, MPTP 组小鼠心率及 RMSSD 在各时间点差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

**2.4 对照组与 MPTP 组运动功能的比较** 见表 4。对照组与 MPTP 组小鼠第 2 ~ 5 周运动功能差异无统计学意义, 第 6 周 MPTP 组小鼠转头时间及爬杆时间显著延长 (均  $P < 0.05$ ), 转棒时间显著减少 (均  $P < 0.05$ )。

表 1 对照组与 MPTP 组胃肠功能的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	排便粒数(颗)				
	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
对照组	15.10 ± 0.84	15.40 ± 0.85	15.80 ± 0.85	15.30 ± 1.01	14.90 ± 0.67
MPTP 组	14.90 ± 1.10	13.60 ± 0.86	13.30 ± 0.61	12.60 ± 0.45	12.10 ± 0.48
<i>t</i> 值	0.14	1.49	2.38	2.44	3.38
<i>P</i> 值	0.89	0.15	<0.05	<0.05	<0.01
组别	粪便含水量(%)				
	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
对照组	60.95 ± 1.01	61.70 ± 1.07	63.22 ± 1.50	62.62 ± 0.99	61.58 ± 1.36
MPTP 组	63.86 ± 1.78	63.52 ± 1.23	62.93 ± 1.64	59.17 ± 0.86	56.55 ± 1.15
<i>t</i> 值	1.42	1.11	0.13	2.62	2.83
<i>P</i> 值	0.17	0.28	0.90	<0.05	<0.05

表2 对照组与MPTP组泌尿功能的比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	1 h 排尿次数(次)				
	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
对照组	1.00 ± 0.15	1.10 ± 0.18	1.30 ± 0.21	1.20 ± 0.13	1.30 ± 0.15
MPTP组	1.40 ± 0.22	1.20 ± 0.13	1.90 ± 0.28	2.40 ± 0.31	2.50 ± 0.27
t值	1.50	0.45	1.72	-3.60	-3.88
P值	0.15	0.66	0.10	<0.01	<0.01

组别	平均单次尿量(ml)				
	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
对照组	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.03
MPTP组	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02
t值	1.46	0.11	1.39	3.10	2.90
P值	0.16	0.92	0.18	<0.01	<0.01

表3 对照组与MPTP组小鼠心率变异性的比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	心率(次/min)				
	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
对照组	518.20 ± 16.21	525.50 ± 13.78	537.30 ± 12.04	531.20 ± 17.89	536.10 ± 15.55
MPTP组	503.20 ± 15.64	516.00 ± 7.97	527.90 ± 16.05	528.20 ± 10.26	531.30 ± 12.89
t值	0.66	0.60	0.47	0.15	0.24
P值	0.52	0.56	0.64	0.89	0.81

组别	RMSSD(ms <sup>2</sup> )				
	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
对照组	1.07 ± 0.21	0.93 ± 0.15	0.91 ± 0.08	0.83 ± 0.11	0.88 ± 0.14
MPTP组	1.20 ± 0.21	1.25 ± 0.09	0.99 ± 0.08	1.04 ± 0.11	0.91 ± 0.12
t值	0.44	1.82	0.71	1.33	0.13
P值	0.67	0.09	0.48	0.20	0.90

表4 对照组与MPTP组运动功能的比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	转头时间(s)				
	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
对照组	2.20 ± 0.25	2.50 ± 0.22	2.60 ± 0.31	2.40 ± 0.16	2.30 ± 0.21
MPTP组	2.30 ± 0.26	2.40 ± 0.27	2.30 ± 0.30	2.50 ± 0.31	3.20 ± 0.29
t值	0.28	0.29	0.70	0.29	2.50
P值	0.78	0.78	0.49	0.78	<0.05

组别	爬竿时间(s)				
	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
对照组	10.10 ± 0.38	10.30 ± 0.78	10.70 ± 0.68	10.10 ± 0.53	10.50 ± 0.70
MPTP组	10.90 ± 0.50	11.10 ± 0.50	10.40 ± 0.54	10.30 ± 0.50	12.90 ± 0.59
t值	1.27	0.86	0.34	0.28	2.62
P值	0.22	0.40	0.73	0.79	<0.05

组别	转棒时间(s)				
	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
对照组	281.20 ± 18.25	269.90 ± 18.29	287.70 ± 9.92	266.20 ± 20.47	288.90 ± 8.53
MPTP组	261.20 ± 17.79	265.30 ± 17.69	271.60 ± 19.36	268.10 ± 14.89	248.90 ± 14.75
t值	0.78	0.18	0.74	0.08	2.35
P值	0.44	0.86	0.47	0.94	<0.05

## 2.5 病理学评估

2.5.1 对照组与 MPTP 组中脑黑质多巴胺能神经元的比较 见图 2。MPTP 组小鼠黑质区域多巴胺能神经元数量 ( $0.60 \pm 0.01$ ) 显著少于对照组 ( $1.00 \pm 0.02$ ) ( $t = 19.00, P < 0.001$ ) , 在组织学上可认定 PD 模型制作成功。

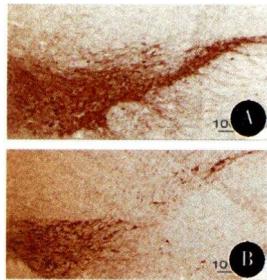


图 2 小鼠中脑黑质区域 TH 免疫组化染色图

A:对照组;B:MPTP 组

2.5.2 对照组与 MPTP 组小鼠中脑 TH 表达的比较 见图 3。与对照组 ( $1.06 \pm 0.10$ ) 相比, MPTP

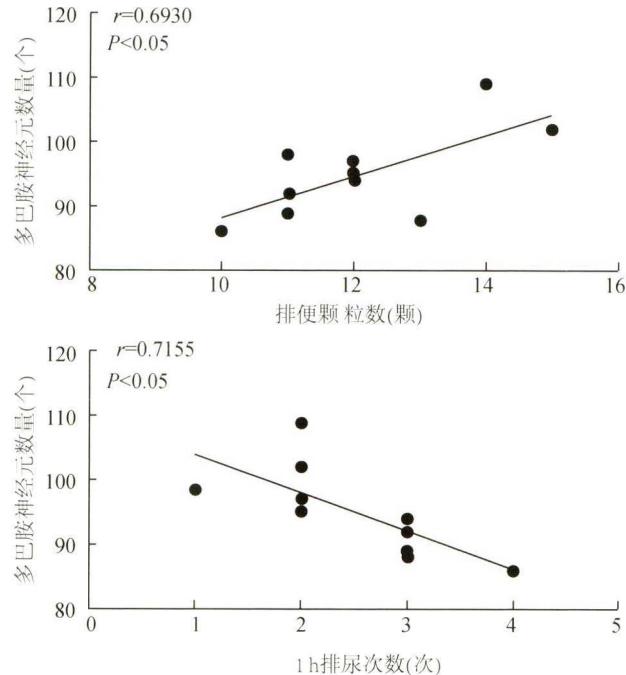


图 4 MPTP 组小鼠中脑多巴胺能神经元数量与胃肠功能、泌尿功能相关性分析

## 3 讨 论

自主神经功能障碍是 PD 重要的非运动症状之一<sup>[8-9]</sup>, 主要包括胃肠道功能不全、心血管功能失调、泌尿系统疾病、性功能障碍、瞳孔调节异常等。自主神经功能障碍可出现在运动障碍前数十年, 且与患者生存期有密切关系<sup>[3]</sup>。但目前 PD 自主神经功能障碍机制尚未完全明确, 且缺乏经典的实验模型。MPTP 是一种神经毒素, 被广泛用于制作 PD 动物模型, 主要通过氧化损伤和抑制线粒体呼吸链复合物造成中枢和周围神经系统儿茶酚胺能丧失, 能够模拟 PD 的病理表现, 病变的严重程度和稳定性取决于给

组中脑 TH 表达下降 ( $0.58 \pm 0.08$ ), 差异有统计学意义 ( $t = 3.67, P < 0.01$ ), 可进一步认定 PD 模型制作成功。

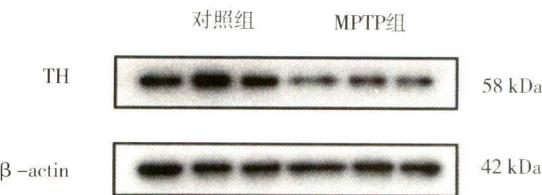
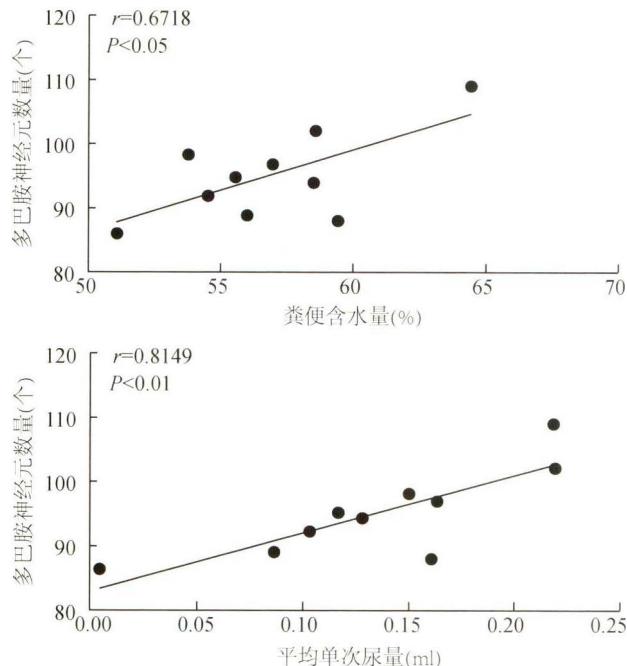


图 3 对照组与 MPTP 组小鼠中脑 TH 表达水平

2.6 MPTP 组小鼠中脑黑质区域多巴胺能神经元数量与胃肠功能、泌尿功能相关性分析 见图 4。MPTP 组小鼠中脑多巴胺能神经元数量与排便颗粒数、粪便含水量以及平均单次尿量呈正相关 ( $r = 0.6930, P < 0.05$ ;  $r = 0.6718, P < 0.05$ ;  $r = 0.8149, P < 0.05$ ), 与 1 h 排尿次数呈负相关 ( $r = -0.7155, P < 0.05$ )。



药方案。常用的 MPTP 小鼠模型根据给药剂量和给药时间不同分为急性、亚急性、慢性模型, 其中急性模型、亚急性模型诱导的黑质纹状体的病变具有显著可逆性, 慢性低剂量模型引起的症状及病理改变呈进行性发展<sup>[4]</sup>, 可模拟 PD 疾病进行性发展过程, 因此本研究通过对 MPTP 慢性诱导的 PD 模型小鼠进行多个时间点、多个自主神经系统功能评估, 探讨 MPTP 制备的慢性 PD 模型小鼠对 PD 自主神经功能障碍研究的适用性。

据报道<sup>[2]</sup>, 88.9% 的 PD 患者在运动症状发作前会出现胃肠道症状, 其中排便障碍的患病率为 77%。既往研究<sup>[6,10-11]</sup>显示, 给予腹膜内急性注射 MPTP[60

mg/(kg·d),4次/d,每次间隔2 h]2~3 d后,小鼠结肠运动短暂增加,7 d后出现肠道延迟转运和便秘,第18 d出现排便频率显著降低,大便质量未见改变。目前关于胃肠功能的研究结果不一致,可能与MPTP给药时间、给药剂量不同有关。但是,相对于急性、亚急性模型,慢性MPTP模型中发现的运动衰退及病理变化更加近似于人类PD的主要改变<sup>[12]</sup>。为此,本研究采用MPTP慢性注射的方法评估两组小鼠的胃肠功能,结果发现MPTP组小鼠在第4周开始出现1 h排便颗粒数下降,第5周、第6周排便颗粒数及粪便含水量均明显下降,提示慢性MPTP注射可引起小鼠早期胃肠功能障碍,可用于PD伴胃肠道功能的相关研究,并且制备该模型所需的时间相对较短,其症状表型较为稳定。

27%~85%的PD患者出现刺激性排尿障碍,表现为夜尿症、尿频、尿急或膀胱排空不良<sup>[2]</sup>。既往有研究<sup>[13]</sup>对MPTP处理的猴模型的泌尿功能进行评估,其膀胱逼尿肌也出现收缩增加。另一项研究<sup>[14]</sup>显示,过表达人α-突触核蛋白的转基因小鼠也表现为膀胱排尿反射亢进、排尿频率增加、单次排尿量减少;在GM2合酶敲除的PD小鼠模型中同样观察到膀胱功能亢进的症状<sup>[15]</sup>。但既往尚无研究评估MPTP模型对小鼠泌尿功能的影响,本研究系首次进行该项研究。研究结果显示,MPTP组小鼠在第5周、第6周排尿次数明显增加,平均单次尿量明显下降,提示慢性MPTP注射也可导致小鼠膀胱逼尿肌反射亢进,表现出类似PD患者的刺激性排尿障碍症状,相对于猴模型或转基因小鼠,制备该模型过程较简单,所需的实验药品及实验动物易获得,可用于PD泌尿功能的评估及相关病理机制的研究。

此外,研究<sup>[16]</sup>显示,PD患者心血管自主神经功能障碍与周围神经的去甲肾上腺素能神经支配丧失有关,心脏交感神经纤维也存在严重耗竭。亚急性MPTP中毒使猴子的交感神经末梢系统受到影响,实验中发现其心外膜神经束中表达酪氨酸羟化酶的轴突数量显著减少<sup>[17]</sup>,与上述研究一致。然而,MPTP治疗后的小鼠心肌神经纤维未见明显异常<sup>[18]</sup>,这可能与物种差异有关。另有研究<sup>[19]</sup>发现,在腹膜内注射MPTP[10 mg/(kg·d),连续4 d]小鼠表现出心率升高以及RMSSD显著下降的特征。本研究同样对小鼠的心血管相关指标进行评估,以明确慢性MPTP注射是否对小鼠造成外周心血管系统的影响。结果显示,两组小鼠心率及心率变异性相关指标无明显差异。曾有研究<sup>[20]</sup>指出,MPTP对啮齿类动物心脏损伤的影响是暂时的。本研究小组推测,药物剂量和给药间隔时间也可能是造成这些研究结果不同的原因,慢

性MPTP间隔给药的方式可能使得模型小鼠心功能损伤相对不明显。既往有研究<sup>[21]</sup>采用MPTP皮下泵诱发小鼠PD样症状。持续缓慢给药的方式或许可以解决这一缺陷,这值得在未来的科学的研究中进一步探索。

本研究发现,经MPTP处理的小鼠于第6周出现运动功能受损,两组小鼠中脑免疫组化染色及蛋白质免疫印迹的结果均提示MPTP诱导的PD慢性小鼠模型中脑多巴胺神经元显著减少,再现了PD运动症状和神经病理特征,提示慢性MPTP皮下注射可成功诱导出PD小鼠模型。既往有研究<sup>[22]</sup>发现,大鼠黑质多巴胺能神经元损耗导致升结肠乙酰胆碱水平降低,多巴胺水平增加以及多巴胺D1和D2受体减少,可引起胃肠运动障碍。另有研究<sup>[23]</sup>显示,与单侧黑质多巴胺能神经元退化相比,双侧受损的PD大鼠表现出更广泛的行为缺陷和尿动力学变化。本研究相关分析结果显示,MPTP组小鼠胃肠功能及泌尿功能障碍与多巴胺能神经元受损也存在一定的相关性,与上述研究一致,均提示脑内多巴胺能神经元丢失可能是PD伴胃肠功能、泌尿功能障碍的原因之一,但具体相关机制有待更多研究来揭示。

PD自主神经功能障碍的症状复杂多变,涉及系统较多,考虑到不同动物模型的局限性对实验设计至关重要,本研究在多个时间点对慢性低剂量MPTP制备的PD模型小鼠自主神经功能进行了评估,以验证该模型对PD自主神经功能障碍研究的适用性。目前关于PD动物模型多系统横向比较的研究分析较少,多数研究仅针对单一系统进行分析。本研究通过对多个自主神经系统进行动态分析发现,MPTP处理小鼠的胃肠功能、泌尿功能障碍均在运动症状之前出现,且胃肠功能障碍发生在泌尿功能障碍之前,心血管功能未见明显损害,中脑多巴胺能神经元受损与胃肠功能、泌尿功能障碍存在着相关性关系,即慢性MPTP皮下注射制备的PD小鼠模型可诱导部分自主神经功能受损,可用于PD早期胃肠及泌尿系统功能的研究,但不适用于心血管功能的研究。本研究也存在一些局限性。首先,本研究未能持续评估更长时间,以观察后期症状是否发生改变;其次,本研究也未能同步观察脑中多巴胺能神经元数量,为全面分析症状与脑内多巴胺能神经元受损的相关性提供综合性依据。因此,今后的研究可以此为基础,进一步探索并构建更加完善的PD伴自主神经功能障碍的动物模型,以帮助进行PD自主神经功能的相关研究。

## [参考文献]

[1] Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. Parkinson disease[J]. Nat Rev

- Dis Primers, 2017, 3:17013.
- [2] Chen Z, Li G, Liu J. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease: implications for pathophysiology, diagnosis, and treatment [J]. Neurobiol Dis, 2020, 134:104700.
- [3] De Pablo-Fernandez E, Tur C, Revesz T, et al. Association of autonomic dysfunction with disease progression and survival in Parkinson disease [J]. JAMA Neurol, 2017, 74(8):970-976.
- [4] Muñoz-Manchado AB, Villadiego J, Romo-Madero S, et al. Chronic and progressive Parkinson's disease MPTP model in adult and aged mice [J]. J Neurochem, 2016, 136(2):373-387.
- [5] Jang Y, Koo JH, Kwon I, et al. Neuroprotective effects of endurance exercise against neuroinflammation in MPTP-induced Parkinson's disease mice [J]. Brain Res, 2017, 1655:186-193.
- [6] Ellett LJ, Hung LW, Munckton R, et al. Restoration of intestinal function in an MPTP model of Parkinson's Disease [J]. Sci Rep, 2016, 6:30269.
- [7] 原文鹏, 张硕峰, 沈欣, 等. 尿频康对大、小鼠排尿的抑制作用及药动学实验 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 5(6):18-20.
- [8] 王文婷, 张忠霞, 陈鸿旭, 等. 伴自主神经功能障碍的帕金森病患者的睡眠结构及其与快速眼动睡眠障碍的相关性 [J]. 临床神经病学杂志, 2019, 32(4):249-253.
- [9] 刘婉, 刘卫国, 谢敏珍, 等. 住院帕金森病患者 24 小时动态血压及心率变化的临床研究 [J]. 临床神经病学杂志, 2019, 32(3):161-165.
- [10] Anderson G, Noorian AR, Taylor G, et al. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Exp Neurol, 2007, 207(1):4-12.
- [11] Natale G, Kastsiushenka O, Fulceri F, et al. MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut [J]. Brain Res, 2010, 1355:195-206.
- [12] Petroske E, Meredith GE, Callen S, et al. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment [J]. Neuroscience, 2001, 106(3):589-601.
- [13] Pritchard S, Jackson MJ, Hikima A, et al. Altered detrusor contractility in MPTP-treated common marmosets with bladder hyperreflexia [J]. PLoS One, 2017, 12(5):e0175797.
- [14] Hamill RW, Tompkins JD, Girard BM, et al. Autonomic dysfunction and plasticity in micturition reflexes in human  $\alpha$ -synuclein mice [J]. Dev Neurobiol, 2012, 72(6):918-936.
- [15] Gil-Tomme C, Vidal-Martinez G, Annette Reyes C, et al. Parkinsonian GM2 synthase knockout mice lacking mature gangliosides develop urinary dysfunction and neurogenic bladder [J]. Exp Neurol, 2019, 311:265-273.
- [16] Mendoza-Velásquez JJ, Flores-Vázquez JF, Barrón-Velázquez E, et al. Autonomic Dysfunction in  $\alpha$ -Synucleinopathies [J]. Front Neurol, 2019, 10:363.
- [17] Carmona-Abellán M, Martínez-Valbuena I, DiCaudo C, et al. Cardiac sympathetic innervation in the MPTP non-human primate model of Parkinson disease [J]. Clin Auton Res, 2019, 29(4):415-425.
- [18] Amino T, Uchihara T, Tsunekawa H, et al. Myocardial nerve fibers are preserved in MPTP-treated mice, despite cardiac sympathetic dysfunction [J]. Neurosci Res, 2008, 60(3):314-318.
- [19] Liu X, Wei B, Bi Q, et al. MPTP-induced impairment of cardiovascular function [J]. Neurotox Res, 2020, 38(1):27-37.
- [20] Fuller RW, Steranka LR. Central and peripheral catecholamine depletion by 1-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine (MPTP) in rodents [J]. Life Sci, 1985, 36(3):243-247.
- [21] Fornai F, Schläter OM, Lenzi P, et al. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(9):3413-3418.
- [22] Garrido-Gil P, Rodriguez-Perez AI, Dominguez-Mejide A, et al. Bidirectional neural interaction between central dopaminergic and gut lesions in Parkinson's disease models [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(9):7297-7316.
- [23] Praveen Rajneesh C, Liou JC, Hsieh TH, et al. The voiding efficiency in rat models with dopaminergic brain lesions induced through unilateral and bilateral intrastriatal injections [J]. PLoS One, 2020, 15(12):e0243452.

(收稿日期 2021-08-16 修回日期 2021-09-26)

## · 信息 ·

### 《临床神经病学杂志》关于及时领取稿酬的通知

本刊刊用的论文在当期杂志发行后 3 周内将会给第一作者寄出稿酬。本刊往期中已多次刊登“关于及时领取稿酬的通知”，对汇款逾期未领被邮局退回汇款不再重寄。目前仍有作者未及时领取汇款，被邮局退回。本刊现再次通知，请作者在论文刊登后注意查收和及时领取稿酬，如稿酬未及时领取被邮局退回，则交上级主管财务部门，本刊不再重寄。特再次告之。

《临床神经病学杂志》编辑部

### 《临床神经病学杂志》微信公众平台邀您关注

为了加强与广大读者、作者以及专家的沟通，及时进行信息反馈，《临床神经病学杂志》微信公众平台于 2015 年 8 月正式开通，欢迎大家关注！

您可通过以下三种方式关注《临床神经病学杂志》微信公众平台：1、搜索公众订阅号名称“临床神经病学杂志”添加关注；2、搜索微信号“lcsjbx”添加关注；3、扫描位于本刊目次页右上角的微信二维码。

《临床神经病学杂志》编辑部