

毕赤酵母表达的 **neurturin** 对恒河猴帕金森氏病模型中黑质多巴胺能神经元的保护作用*

李鸿钧** 苏婷 马雁冰 和占龙 鲁帅尧 戴长柏 孙茂盛

(中国医学科学院 医学生物学研究所, 昆明 650118)
(中国协和医科大学)

摘要 帕金森氏病 (PD) 是由于多巴胺能神经元变性、坏死, 导致黑质-纹状体系统的多巴胺含量下降而引起的一种神经系统退行性疾病, 目前还没有一种很好的方法能使之治愈。Neurturin (NTN) 能特异地作用于中脑多巴胺能神经元, 对该类神经元起营养和保护作用。经静脉注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 诱导恒河猴产生帕金森氏病模型, 并在 NTN 治疗组, 注射 MPTP 之前 48 h 脑室内注射重组毕赤酵母表达的人 NTN 1 mg。结果表明: 模型组猴均逐渐出现了 PD 症状, 而 NTN 治疗组猴, PD 症状比较轻或不明显; 荧光分光光度法测定 MPTP 模型组猴黑质、壳核和尾状核多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT) 和 5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 的含量结果与正常对照组相比均显著降低, NTN 治疗组猴的黑质、壳核和尾状核中的 DA、5-HT 和 5-HIAA 与对照组相比无显著性差异, 而与模型组相比, DA、5-HT 和 5-HIAA 含量均明显增加; 光镜检查 MPTP 模型组猴黑质神经元细胞明显脱失, 而 NTN 治疗组猴黑质神经元细胞丢失不明显, 与正常对照组猴无差别。上述结果表明, 制备的重组人 NTN 在恒河猴体内能保护中脑黑质多巴胺能神经元不受 MPTP 的损伤, 使其 DA 含量及多巴胺能神经元维持正常, 在 MPTP 存在下没有发生 PD 症状。

关键词 Neurturin, MPTP, 多巴胺能神经元, 多巴胺, 5-羟色胺, 5-羟吲哚乙酸

学科分类号 R742.5, R-332

帕金森氏病 (PD) 是多发于中老年期的一种缓慢进展的神经系统退行性疾病。由于患者脑部黑质多巴胺能神经元变性、坏死造成黑质-纹状体系统的多巴胺含量下降从而导致震颤, 肌肉僵直, 运动迟缓与体位不稳等临床症状^[1]。临床上主要使用左旋多巴替代疗法, 虽然在短时间内能明显改善症状, 但此疗法不能减慢疾病的进展, 且长期用药副作用大^[2], 因此, 寻找一种新的方法对于帕金森氏病的治疗具有重要意义。

近年来的研究表明, 许多神经营养因子如 BDNF、NT-3 及 GDNF 等在体内外均能保护中脑多巴胺能神经元^[3~5]。NTN 是新近发现的一种神经营养因子, 它与 GDNF 同属于 TGF- β 超家族的成员, 二者具有相似的空间结构及生理功能, 能特异地作用于中脑多巴胺能神经元, 对多巴胺能神经元具有明显的营养与保护作用, 对于帕金森氏病的治疗具有重要的临床意义^[6]。

本实验以神经毒素 MPTP 诱导恒河猴产生帕金森氏病模型, 并通过脑室内注射重组的人 NTN, 结果表明, 重组的人 NTN 在体内能对抗 MPTP 的毒性并能保护和修复中脑黑质多巴胺能神经元。

1 材料与方法

1.1 分组与用药

取正常成年恒河猴 (雄性和雌性) 8 只, 体重 4.0 ~ 6.0 kg, 随机分成三组, 即正常对照组 2 只, MPTP 模型组 3 只及 NTN 治疗组 3 只。MPTP (购自 Sigma 公司) 溶于 0.9% 生理盐水, 终浓度为 4 g/L。在给 MPTP 之前 48 h, NTN 治疗组 3 只猴脑室内注射重组毕赤酵母表达的人 NTN (本室制备) 1 ml (浓度为 1.0 g/L), MPTP 模型组猴脑室内注射等剂量生理盐水。然后 NTN 治疗组及模型组猴下肢隐静脉注射 MPTP, 用药剂量和时间: 首先按 0.3 mg/kg 给药, 1 次/天, 共 4 天, 然后按 0.38 mg/kg, 1 次/天, 共 3 天, 总共给 MPTP 7 天, 同时对照组每日给相应量的生理盐水。

1.2 神经生化测定

给药后每天观察猴的行为活动, 将猴于末次注射 MPTP 后 21 天处死, 采用 Miller 等^[7] 的荧光分

* 云南省自然科学基金资助项目 (2003C0026Q)。

** 通讯联系人。

Tel: 0871-8334401, Fax: 0871-8334483

E-mail: lihj6912@hotmail.com

收稿日期: 2004-02-05, 接受日期: 2004-03-30

光光度法并略作改进, 检测实验组和对照组猴黑质、壳核和尾状核多巴胺, 5-羟色胺和 5-HIAA 的含量. 具体实验步骤如下: 将猴处死后, 迅速取出脑组织, 分离出黑质、壳核及尾状核. 称重后加入 10 倍体积的酸性正丁醇匀浆, 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 2.5 ml 加正庚烷 5 ml, 0.1 mol/L HCl 1 ml, 振荡 5 min, 2 500 r/min 离心 5 min. 取水相 0.5 ml 加 0.067 mol/L 磷酸缓冲液 1.5 ml pH 7.2 及 EDTA 0.4 ml 混合后加入碘试剂 0.2 ml 并混匀, 放置 3 min, 加入碱性亚硫酸钠 0.4 ml, 放置 3 min, 加 5 mol/L 冰醋酸 0.4 ml, 沸水浴 15 min, 320/375 nm 测定多巴胺的荧光强度; 另取水相 0.4 ml 加 0.25% 半胱氨酸 0.1 ml, 混匀, 加入 0.001% 邻苯二甲醛 (Sigma 公司) -8 mol/L HCl 溶液 3 ml, 充分混匀, 沸水浴 10 min, 水中冷却后测定 5-HT 的荧光强度 ($\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 480$ nm); 另取有机相 6 ml 加入 0.038 mol/L NaHCO₃ 0.6 ml, 振荡 5 min 后离心, 2 500 r/min 5 min, 取水相 0.4 ml, 加 0.25% 半胱氨酸 0.1 ml, 混匀, 加入 0.001% OPT -10 mol/L HCl 溶液 2.5 ml, 充分混匀, 沸水浴 10 min, 水中冷却后测定 5-HIAA 的荧光强度 ($\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 480$ nm). 根据测定的荧光强度与标准品相比较从而得到 DA、5-HT 及 5-HIAA 的含量.

1.3 组织病理切片

猴处死后分离脑组织, 经 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 取中脑部位作连续冠状切片, HE 染色观察结果.

2 结果

2.1 行为观察

急性反应: NTN 治疗组与 MPTP 模型组猴在第 3 次静脉注射 MPTP 后 3~4 min 发生, 每次持续约 15~20 min, 主要表现为间歇性闭眼、自发运动减少、不同程度的瞳孔扩大、嗜睡、心跳加快, 身体摇晃, 对声音和痛刺激仅有凝视或惊恐反应, 以后每次用药在模型对照组该反应重复出现并逐渐加重, 而在 NTN 治疗组随着用药的进程症状反而不太明显, 并逐渐减轻. 在正常对照组猴未观察到上述症状.

PD 症状: 在 MPTP 开始注射后的第 6 天起, MPTP 模型组猴逐渐表现为两眼凝视、表情呆板、瞬目减少、行动迟缓、自发性动作明显减少、肢体姿势性震颤、肌张力增高、发音低弱、有的猴出现吞咽困难; 有时表现出短暂发作性行为异常 (矛盾性运动) 或运动散失 (冻结现象). 随着时间的推移, 症状逐日加重, 以致几乎不能活动, 仅能俯身或侧卧, 进食困难, 严重者每日必需鼻饲牛奶维持生命. 而 NTN 治疗组猴症状较轻或没有上述症状出现.

2.2 神经生化改变

应用荧光分光光度法测定 NTN 治疗组、MPTP 模型组及正常对照组猴黑质、壳核和尾状核 DA、5-HT 和 5-HIAA 含量的结果见表 1. 可见, 模型组接受 MPTP 注射后, 猴的黑质、壳核和尾状核中的 DA、5-HT 和 5-HIAA 的含量与对照组相比明显减少,

Table 1 Levels of DA, 5-HT, and 5-HIAA

Group area	DA	5-HT	5-HIAA
ng/g			
NTN treatment group			
Sn	3 108 ± 218*	4 619 ± 188***	5 900 ± 190**
Pu	1 482 ± 81*	3 208 ± 293**	4 247 ± 380**
Cn	2 328 ± 177**	3 043 ± 206***	8 123 ± 832*
MPTP model group			
Sn	1 467 ± 294***	3 095 ± 294**	2 156 ± 311***
Pu	813 ± 166*	1 449 ± 396**	1 131 ± 195***
Cn	1 508 ± 161**	1 137 ± 254***	1 192 ± 307***
Control group			
Sn	4 088 ± 207	4 896 ± 177	6 827 ± 715
Pu	1 787 ± 183	3 810 ± 511	4 191 ± 313
Cn	2 255 ± 316	3 269 ± 206	9 582 ± 1551

Sn: substantia nigra, Pu: putamen, Cn: caudate nucleus. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ## $P > 0.05$, ### $P > 0.2$, #### $P > 0.5$.

其中 DA 含量分别减少 64.1% ($P < 0.001$)、54.5% ($P < 0.05$) 和 33.15% ($P < 0.01$), 5-HT 的含量分别减少 36.8% ($P < 0.01$)、62.0% ($P < 0.01$) 和 65.2% ($P < 0.001$), 5-HIAA 的含量分别减少 68.4%, 73.0% 和 87.6% ($P < 0.001$). 而 NTN 治疗组在静脉注射 MPTP 之前, 脑内注射毕赤酵母表达的人 NTN, 该组猴的黑质、壳核和尾状核中的 DA、5-HT 和 5-HIAA 与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 而与模型组相比, 明显增加, 其中 DA 分别增加 52.8% ($P < 0.01$)、

45.1% ($P < 0.01$) 和 35.2% ($P < 0.05$), 5-HT 分别增加 33.0% ($P < 0.05$)、54.8% ($P < 0.01$) 和 62.6% ($P < 0.01$), 5-HIAA 分别增加 63.5%, 73.3% 和 85.3% ($P < 0.001$).

2.3 神经病理改变

中脑病理切片光镜观察发现, 与正常对照组猴相比, MPTP 模型组猴黑质神经元细胞明显脱失, 而 NTN 治疗组猴黑质神经元细胞丢失不明显, 神经细胞数与正常对照组猴差别不大 (图 1).

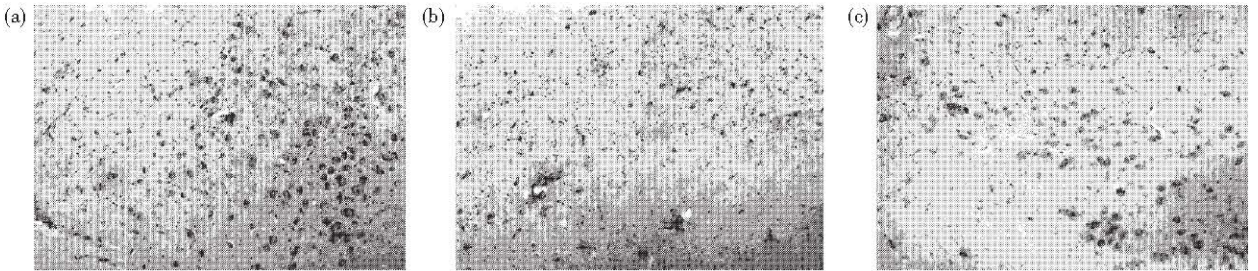


Fig. 1 Transverse sections through the midbrains showing the substantia nigra of a normal monkey (a), MPTP-administrated monkey (b) and NTN treated before MPTP administration monkey (c)

Severe nerve cell loss in MPTP administrated animal, but in NTN treated monkey, NTN can protect the dopaminergic neurons, there is no nerve cell loss (HE stain, $\times 100$).

3 讨 论

帕金森氏病是一种严重危害中老年人的神经系统疾病, 目前临床上的治疗方法仅能缓解症状, 不能从根本上去除病因, 也不能延缓疾病的进展. 随着对该病的深入研究, 人们发现其病因主要是由于黑质多巴胺能神经元变性, 使纹状体内多巴胺含量不足, 从而导致胆碱能神经元功能亢进而引起临床症状^[8]. 针对该病的病因, 人们进行了许多研究以寻找新的治疗方法.

神经营养因子能促进神经元细胞的存活及预防由于损伤、毒素及神经疾病所导致的神经元细胞退行性病变^[9], 尤其是 GDNF 家族神经营养因子的发现, 给帕金森氏病的治疗带来了新的希望. GDNF 家族共有 4 个成员, 分别是 GDNF、NTN、PSP 及 ARTN, 四者均能够特异地作用于中脑多巴胺能神经元, 促进多巴胺能神经元的存活及对其起营养与保护作用^[10]. 过去的研究表明, 在 MPTP 诱导的 C57/BL 小鼠帕金森氏病模型中, GDNF 能够保护和修复中脑黑质多巴胺能神经元免受 MPTP 的毒性^[11]. 我们先前的研究结果, 在毕赤酵母中

获得了人 NTN 的表达, 并纯化获得了有生物活性的重组人 NTN, 制备的 NTN 在体外能促进培养的大鼠胚胎中脑多巴胺能神经元的存活, 对多巴胺能神经元具有营养作用, 为进一步研究 NTN 的体内活性及为帕金森氏病的治疗研究打下了基础^[12].

MPTP 是一种神经毒素, 曾有人因注射内含 MPTP 的药物而产生严重的帕金森氏综合征^[13], 随后, 人们成功地利用 MPTP 制备了恒河猴 PD 模型及 C57/BL 小鼠纹状体 DA 不足动物模型, 迄今为止, MPTP 是一种公认的制备帕金森氏病动物模型的首选药物^[14,15]. 本实验选用恒河猴作为实验动物, 静脉注射 MPTP 建立帕金森氏病模型, 同时在实验组猴注射 MPTP 之前, 脑内注射重组的人 NTN, 以考察 NTN 在体内对猴黑质多巴胺能神经元的保护作用. 在注射 MPTP 的早期, NTN 治疗组和模型组猴均出现急性症状, 可能为急性血清素样反应, 实验的第 6 天起, 模型组猴均逐渐出现了 PD 症状, 且症状越来越加重, 而 NTN 治疗组猴, PD 症状比较轻或不明显. 荧光分光光度法测定 MPTP 模型组猴黑质、壳核和尾状核 DA、5-HT 和 5-HIAA 的含量结果与正常对照组相比均显著降低,

NTN 治疗组在静注 MPTP 之前, 脑内注射重组的人 NTN, 该组猴的黑质、壳核和尾状核中的 DA、5-HT 和 5-HIAA 与对照组相比无显著性差异, 而与模型组相比, DA、5-HT 和 5-HIAA 含量均明显增加. 光镜检查 MPTP 模型组猴黑质神经元细胞明显脱失, 而 NTN 治疗组猴黑质神经元细胞丢失不明显, 神经细胞数与正常对照组猴差别不大. 表明 MPTP 主要选择性地损害黑质多巴胺能神经元, 造成黑质纹状体系统 DA 含量显著降低, 而我们制备的毕赤酵母表达的重组人 NTN 在恒河猴体内能保护中脑黑质多巴胺能神经元不受 MPTP 的损伤, 使其 DA 含量及多巴胺能神经元维持正常, 在 MPTP 存在下没有发生 PD 症状.

总之, 本研究利用 MPTP 建立恒河猴 PD 模型, 并观察了重组 NTN 在猴体内对多巴胺能神经元的保护作用, 此项研究为帕金森氏病的治疗研究打下了基础.

参 考 文 献

- 1 Kastner A, Hirsch E C, Agid Y, *et al.* Tyrosine hydroxylase protein and messenger RNA in the dopaminergic nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Brain Research*, 1993, **606** (2): 341 ~ 345
- 2 Barr E, Leiden J M. Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. *Science*, 1991, **254** (5037): 1507 ~ 1509
- 3 Beck K D, Knusel B, Hefti F. The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des (1-3) -insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience*, 1993, **52** (4): 855 ~ 866
- 4 Hyman C, Hofer M, Barde Y A, *et al.* BDNF is a neurotrophic

factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, 1991, **350** (6315): 230 ~ 232

- 5 Otto D, Unsicker K. Basic FGF reverses chemical and morphological deficits in the nigrostriatal system of MPTP-treated mice. *J Neurosci*, 1990, **10** (6): 1912 ~ 1921
- 6 Kotzbauer P T, Lampe P A, Heuckeroth R O, *et al.* Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*, 1996, **384** (6608): 467 ~ 470
- 7 Miller F P, Cox R H Jr, Maickel R P. The effects of altered brain norepinephrine levels on continuous avoidance responding and the action of amphetamines. *Neuropharmacology*, 1970, **9** (6): 511 ~ 517
- 8 Willner P. Dopamine and depression: a review of recent evidence. I. Empirical studies. *Brain Res*, 1983, **287** (3): 211 ~ 224
- 9 Baloh R H, Tansey M G, Lampe P A, *et al.* Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron*, 1998, **21** (6): 1291 ~ 1302
- 10 Saarna M, Sariola H. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech*, 1999, **45** (4~5): 292 ~ 302
- 11 Tomac A, Lindqvist E, Lin L F, *et al.* Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF *in vivo*. *Nature*, 1995, **373** (6512): 335 ~ 339
- 12 Li H J, Ma Y B, Su T, *et al.* Expression, purification and characterization of recombinant human neurturin secreted from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2003, **30** (2): 11 ~ 17
- 13 Langston J W, Ballard P, Tetrud J W, *et al.* Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 1983, **219** (4587): 979 ~ 980
- 14 Burns R S, Chiu C C, Markey S P, *et al.* A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80** (14): 4546 ~ 4550
- 15 Hallman H, Lange J, Olson L, *et al.* Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurones in the mouse. *J Neurochem*, 1985, **44** (1): 117 ~ 127

Protection of Dopaminergic Neurons by Recombinant Neurturin Secreted From *Pichia pastoris* in a Rhesus Monkey Model of Parkinson's Disease *

LI Hong-Jun**, SU Ting, MA Yan-Bing, HE Zhang-Long, LU Shuai-Yao, DAI Chang-Bai, SUN Mao-Sheng
(*Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China*)

Abstract Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease due to lack of dopamine (DA) in nigrostriatal system resulting from the degeneration and necrosis of dopaminergic neurons. No effective cure has been found. Neurturin (NTN) has been demonstrated to protect mesencephalic dopaminergic neurons specifically. Parkinson's disease was induced in rhesus monkeys by injection of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). Rhesus monkeys were randomly divided into a PD model, NTN treatment and normal control groups. In the NTN treatment group, 1 mg of *Pichia pastoris*-derived recombinant human NTN was injected into the cerebral ventricles 48 h prior to injection of MPTP. Rhesus monkeys in the PD model group acquired PD symptoms that progressed over time, while monkeys treated with NTN had less apparent or no symptoms. Using fluorospectrophotometry, the dopamine (DA), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and the 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in substantia nigra,

putamen and caudate nucleus in monkeys from the model group were found to be significantly lower than in the normal control group. No significant differences were found between the NTN treatment and normal control groups, but the contents of DA, 5-HT and 5-HIAA in the NTN treatment group were higher than those observed in the PD model group. A dramatic loss of neurons in the substantia nigra in monkeys in the PD model group was observed by light microscopy, while no obvious loss was observed in the NTN treatment group in which the numbers of neurons were similar to those in normal controls. These results indicate that *Pichia pastoris*-derived recombinant human NTN can prevent PD symptoms as well as protect dopaminergic neurons and preserve DA content in midbrain substantia nigra in rhesus monkeys exposed to MPTP.

Key words neurturin, MPTP, dopaminergic neurons, dopamine, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid

* This work was supported by a grant from The Yunnan Natural Science Foundation (2003C0026Q).

** Corresponding author. Tel: 86-871-8334401, Fax: 86-871-8334483, E-mail: lihj6912@hotmail.com

Received: February 5, 2004 Accepted: March 30, 2004

科学出版社生命科学编辑部新书推介

《细胞生物学导学》

主 编: 李先文、张苏锋、袁正仿、陈世锋

2004年6月出版

ISBN 7-03-013319-6/Q. 1412

B5开, 定价: 28.00元

本书是高等院校细胞生物学专业的教学辅导书。本书以当今最有影响的几部细胞生物学教科书的知识体系为基本框架, 首先用简洁的文字概括地介绍了细胞生物学各个领域的基本知识及其研究状况。进而, 站在学科发展与专业人才培养的高度上拟定了学习要求、重点难点等学习指导性纲要。然后, 在明确基本概念的基础上, 提出有启发性的问题并给予解答, 尤其对有歧义的问题作出了合理的分析。每章都配有要点提示及强化练习。书末还配有自测题和研究生招生模拟试题, 所有题目均备有参考答案。

本书适合作为高等院校生命科学专业的初学者及考研生的参考书, 也适合教师教学参考。

《组织工程》(影印)

2004年6月出版

ISBN 7-03-013407-9/Q. 1425

大16开, 定价: ¥55.00

本书是 Prentice Hall 出版社新近推出的生物工程原理与应用丛书之一, 全面阐释了主要生理组织的当前生物工程研究, 包括心血管、内分泌、神经、视觉、听觉、消化和呼吸系统。主要分为四部分: 定量细胞和组织生物

学, 包括组织块、组织动力学、形态发生、干细胞、细胞程序与调和等; 细胞和组织分化, 包括高通量生物学数据、细胞和组织特性、细胞和组织培养和基因转移等; 工程学方法与设计, 包括时间常数、缩放比例、细胞分离、生物材料成型与制作等; 临床应用, 包括常规方式、宿主适应和治疗性组织的生产等。

本书为读者提供了众多实用的定义、生理基础数据表格以及参考书目、索引。同时, 还介绍了骨髓、骨骼肌和软骨等组织器官的组织工程。此外, 还提出了组织工程研究中的一些难点和重点问题。通过阅读本书, 读者会对组织工程及其细胞生物学基础有一个全面清晰的了解, 也会获得更多创新的想法来进一步探索这一日益发展并且壮大的研究领域。

本书适合生物工程、生物材料、生物医学、生物化学、分子生物学以及医学等相关研究领域的高年级本科生、研究生以及教学科研人员参考使用。

《用于蛋白质组学的蛋白质纯化实验指南》(影印) 分子克隆实验指南系列

Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press

2004年6月出版

ISBN 7-03-013387-0/Q. 1423

16开, 定价: 98.00元

本书详细论述了用于蛋白质组学研究的蛋白质纯化实验技术。