

·论著·

## 长期丰富环境对由神经毒素MPTP所致的帕金森病小鼠模型抑郁情绪的作用

车祥源<sup>1</sup>, 郑志勇<sup>1</sup>, 李超堃<sup>2</sup>, 邢红霞<sup>3</sup>

1. 新乡医学院第一附属医院神经内科/河南省神经修复重点实验室, 河南 新乡 453100

2. 新乡医学院基础医学院生理学与神经生物学教研室, 河南 新乡 453000

3. 新乡医学院第三附属医院神经内科, 河南 新乡 453003

**摘要:**目的 探讨长期丰富环境(EE)对由神经毒素MPTP所致的帕金森病(PD)小鼠模型抑郁情绪的作用。方法 采用随机分组法将40只7月龄雄性C57BL/6N小鼠,分为EE+MPTP组、EE+NS组、SE+MPTP组与SE+NS组,每组10只。EE组和标准环境(SE)组在干预3个月后,MPTP组小鼠进行神经毒素MPTP造模(腹腔注射,30 mg/kg),每天注药1次,连续7 d;NS组给予腹腔注射等量的0.9%NaCl作为对照观察。采用行为学方法评估小鼠行为学表现。行免疫组织化学染色方法观察酪氨酸羟化酶(TH)与5-HT<sub>1A</sub>受体阳性面密度值变化情况。结果 行为学结果显示MPTP组小鼠的强迫游泳评分较NS组小鼠低( $P<0.01$ );悬尾实验静止不动时间延长( $P<0.01$ )。EE+MPTP组的上述抑郁表现轻于SE+MPTP组( $P<0.05$ )。从免疫组织化学染色结果中发现,SE+MPTP组和EE+MPTP组小鼠的TH与5-HT<sub>1A</sub>受体阳性表达水平较NS组小鼠降低( $P<0.01$ ),而EE+MPTP组小鼠TH及5-HT<sub>1A</sub>受体阳性表达水平降低程度较SE+MPTP组小鼠小( $P<0.05$ )。结论 MPTP小鼠的行为学异常以及TH阳性面密度值减少提示PD模型制作成功。EE+MPTP组小鼠5-HT<sub>1A</sub>受体受损较SE+MPTP组小鼠轻,提示丰富环境可能缓解MPTP诱导的PD小鼠模型的抑郁情绪。

[国际神经病学神经外科学杂志,2021,48(3): 239-243]

**关键词:**帕金森病;丰富环境;1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶;行为学;5-HT<sub>1A</sub>受体;抑郁情绪;小鼠

中图分类号:R742.5

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.03.006

## Effect of long-term environmental enrichment on depressed mood in a mouse Parkinson's disease model induced by neurotoxin MPTP

CHE Xiang-Yuan<sup>1</sup>, ZHENG Zhi-Yong<sup>1</sup>, LI Chao-Kun<sup>2</sup>, XING Hong-Xia<sup>3</sup>

1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University/Henan Provincial Key Laboratory of Nerve Repair, Xinxiang, Henan 453100, China

2. Department of Physiology and Neurobiology, School of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China

3. Department of Neurology, Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China

Corresponding author: XING Hong-Xia, Email: xhxwh02@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of long-term environmental enrichment (EE) on depressed mood in a mouse Parkinson's disease (PD) model induced by neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP).

**Methods** A total of 40 seven-month-old male C57BL/6N mice were randomly divided into EE+MPTP ( $n=10$ ), EE+normal saline (NS) ( $n=10$ ), standard environment (SE)+MPTP ( $n=10$ ), and SE+NS ( $n=10$ ) groups. After three months of intervention with EE or SE, the mice in the MPTP groups were subjected to neurotoxin MPTP (intraperitoneal injection, 30 mg/kg) once daily for 7 consecutive days for modeling. The mice in the NS groups were given intraperitoneal injection of the same

收稿日期:2020-12-29;修回日期:2021-03-30

作者简介:车祥源(1993-),男,硕士,研究方向:帕金森病的基础与临床研究。

通信作者:邢红霞(1972-),女,主任医师,教授,医学博士,硕士生导师,研究方向:帕金森病的基础与临床研究。Email:xhxwh02@163.com。

amount of 0.9%NaCl as the control study. Behavioral methods were used to evaluate the behavioral manifestations of mice, and immunohistochemical staining was performed to observe the positive areal density values of tyrosine hydroxylase (TH) and 5-hydroxytryptamine 1A (5-HT<sub>1A</sub>) receptor. **Results** The behavioral results showed that the mice in the MPTP groups had a significantly lower forced swimming score ( $P<0.01$ ) and a significantly long erimmobility time in the tail suspension test ( $P<0.01$ ) than those in the NS groups. The mice in the EE+MPTP group had significantly milder depression symptoms mentioned above than those in the SE+MPTP group ( $P<0.05$ ). The results of immunohistochemical staining showed that the mice in the SE+MPTP group and EE+MPTP group had significantly lower positive expression levels of TH and 5-HT<sub>1A</sub> receptor than those in the NS groups ( $P<0.01$ ), while the mice in the EE+MPTP group had significantly smaller decreases in positive expression levels of TH and 5-HT<sub>1A</sub> receptor than those in the SE+MPTP group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The behavioral abnormalities of MPTP mice and the reduction in TH positive areal density value suggested that the PD model was successfully established. The mice in the EE+MTPT group had significantly milder 5-HT<sub>1A</sub> receptor damage than those in the SE+MPTP group, suggesting that environmental enrichment may alleviate the depressed mood in the MPTP-induced PD model in mice.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(3): 239-243]

**Keywords:** Parkinson's disease; environmental enrichment; 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; behavioristics; 5-hydroxytryptamine 1A receptor; depression mood; mouse

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种临床上常见的神经退行性疾病,大多见于老年人。主要临床表现为肌肉僵硬、姿势步态异常、静息性震颤以及运动迟缓。当前诊疗手段与技术水平尚不能解释PD的确切病因,临床治疗如药物与手术等治疗手段只能改善症状,并且随着病情的进展药物治疗的效果也会大打折扣<sup>[1]</sup>。PD患者易出现焦虑、抑郁以及其他负面情绪,从而进一步降低其生活质量。抑郁是PD相当常见的非运动症状之一,据统计发病率约为11.17%<sup>[2]</sup>,可贯穿PD发病的各个阶段,甚至可早于运动症状的出现<sup>[3]</sup>。抑郁对患者以及护理人员的生活质量均产生着巨大的影响。抑郁症在发病初期很难识别,因此通常在治疗中被延迟或误诊<sup>[4]</sup>。近年来,丰富环境(enriched environment, EE)与标准环境(standard environment)相关的研究越来越受到学者们的重视。研究报道,EE通过影响神经元的可塑性,对阿尔兹海默症(Alzheimer disease, AD)以及亨廷顿氏舞蹈病(Huntington disease, HD)等多种神经系统疾病有益<sup>[5-6]</sup>。那么,EE能否改善帕金森相关抑郁呢?本研究通过采用神经毒素1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP)和7月龄C57BL/6n雄性小鼠制备PD模型,探讨EE对PD相关抑郁的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

7月龄SPF级雄性C57BL/6N小鼠40只,体重25g左右,购自郑州市惠济区华兴动物养殖场[SCXK(豫)2019-0002]。采用随机原则将40只小鼠分为EE组(20只)与SE组(20只),各组再分别分为两个亚组,分别为EE+MPTP组、SE+MPTP组、EE+NS组和SE+NS组,每组10只。

### 1.2 实验仪器与试剂

1.2.1 试剂 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(Macklin公司);5-羟色胺1A(5-hydroxytryptamine 1A, 5-HT<sub>1A</sub>)单克隆抗体(BOSTER公司);Anti-Tyrosine-Hydroxylase Mouse mAb(Servicebio公司)。

1.2.2 实验仪器 显微镜(COIC);掌上离心机(Servicebio公司);包埋机(武汉俊杰电子有限公司);移液枪(Dragon);Image-pro plus 6.0(Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);SuperMaze动物行为学视频分析系统(上海欣软实验公司)。

### 1.3 丰富环境与标准环境

1.3.1 丰富环境 制做尺寸为90 cm×80 cm×35 cm(长×宽×高)的亚克力板笼具,将小鼠隧道、简易迷宫、庇护所、攀爬板、踩翘板等五颜六色的小鼠玩物置于笼具中,每日用酒精棉布擦拭小鼠玩具后调换其方位,以增加小鼠新奇感。1个笼具中放入10只小鼠。见图1。



图1 丰富环境饲养笼具

1.3.2 标准环境 在M1型实验小鼠笼(28 cm×18 cm×15 cm)仅给予饮水与饲料常规饲养。1个笼具中放入2只小鼠。

## 1.4 模型制备

本研究采用亚急性性造模形式,将MPTP按30 mg/kg的剂量调配,连续腹腔注射7 d<sup>[7]</sup>。EE组小鼠在丰富环境干预3个月;MPTP组小鼠给予腹腔注射MPTP(30 mg/kg),连续注射7 d;NS组给予腹腔注射等量的生理盐水。

## 1.5 行为学实验

**1.5.1 强迫游泳实验** 在给药后16~18 d行强迫游泳实验(FST)3次。在透明盒子内(25 cm×35 cm×25 cm)注水后放入测试小鼠并观察,水温为23~26℃。评分标准如下:①受试鼠能持续游泳5分钟评价为30分;②受试鼠间断休息时间不超过2.5分钟评价为25分;③受试鼠间断休息时间超过2.5分钟评价为20分;④偶尔游泳者评价为15分;⑤受试鼠持续休息未游泳评价为10分。取3次得分平均值并作统计学分析<sup>[8]</sup>。

**1.5.2 悬尾实验** 在给药后19~21 d行悬尾实验(TST)3次。用医用胶带将受试小鼠尾端(在距尾尖部2~3 cm处)粘于悬尾箱上部支架上成倒挂样,小鼠为摆脱非正常体位而不断挣扎,但活动一段时间后会现出间断性行为为绝望状态,悬挂时间设置为6 min,Supermaze系统分析并记录6 min内悬尾累计不动时间(小鼠停止挣扎或无任何活动即为不动状态),以该不动时间作为衡量抗抑郁效果的指标。取3次得分平均值并作统计学分析<sup>[9]</sup>。

## 1.6 心脏灌流及取材

结束行为学实验后,EE+NS组与SE+NS组中分别取6只小鼠,EE+MPTP组与SE+MPTP组中分别取8只小鼠,经腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉,打开胸腔,暴露心脏,将针头刺入左心室,同时剪破右心耳,经左心室快速灌注50 mL 0.9% NaCl,随后灌注4%多聚甲醛100 mL进行固定(注意控制输液器滴速,灌注时间约30 min)。灌注结束后,用镊子缓慢取出内固定后的脑组织,并将其置于4%多聚甲醛中继续外固定24 h。固定结束后将脑组织进行石蜡包埋切片。

## 1.7 免疫组织化学测定

石蜡切片脱蜡至水后将组织切片置于盛满EDTA(pH 9.0)抗原修复液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,自然冷却后将玻片置于PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。抗原修复后阻断内源性过氧化物酶,将切片放入3%双氧水溶液,室温避光孵育25 min,将玻片置于PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。血清封闭30 min后加一抗[酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体稀释度为1:2 000;5-羟色胺1A(5-hydroxytryptamine, 5-HT<sub>1A</sub>)抗体稀释度为1:200;反应条件均为4℃过夜],玻片置于PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的二抗(HRP标记)覆盖组织,室温孵育50 min。孵育结束后将玻片置于PBS(pH 7.4)中在

脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的DAB显色液,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,自来水冲洗切片终止显色。苏木素复染细胞核。最后将切片依次放入75%酒精5 min>85%酒精5 min>无水乙醇Ⅰ5 min>无水乙醇Ⅱ5 min>二甲苯Ⅰ5 min中脱水透明,将切片从二甲苯拿出来稍晾干,中性树脂封片,显微镜镜检,图像采集分析,每只小鼠取富含靶细胞的同一部位切片3张,200倍光学显微镜观察,并取3张面密度值的平均值。应用Image-Pro Plus 6.0软件分析出面密度值(OD/AREA),值越大表明阳性表达水平越高。

## 1.8 统计学方法

采用SPSS 26.0版本进行统计学分析。数据分析前经正态性分布检验与方差齐性检验。正态分布计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 行为学实验

**2.1.1 强迫游泳实验** EE+NS组分值(27.00±1.72)和SE+NS组分值(27.50±1.18)比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与NS组相比,EE+MPTP组分值(15.17±2.99)与SE+MPTP组分值(12.67±2.11)均降低( $P < 0.01$ );EE+MPTP组分值降低程度较SE+MPTP组轻,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图2。

**2.1.2 悬尾实验** EE+NS组(88.93±16.12)s和SE+NS组(99.43±15.15)s小鼠静止不动时间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与NS组相比,EE+MPTP组与SE+MPTP组的静止不动时间均增加( $P < 0.01$ );EE+MPTP组静止不动时间增加程度较SE+MPTP组轻,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图2。

### 2.2 免疫组织化学测定

**2.2.1 酪氨酸羟化酶免疫组织化学测定** EE+NS组阳性面密度值与SE+NS组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与NS组相比,EE+MPTP组与SE+MPTP组的阳性面密度值均降低( $P < 0.01$ );EE+MPTP组阳性面密度值降低程度较SE+MPTP组减轻( $P < 0.05$ )。见图3、图4。

**2.2.2 5-羟色胺1A受体免疫组织化学测定** EE+NS组阳性面密度值与SE+NS组相比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与EE+NS组相比,EE+MPTP组与SE+MPTP组的阳性面密度值均降低( $P < 0.01$ );SE+NS组相比,EE+MPTP组与SE+MPTP组的阳性面密度值均降低( $P < 0.01$ );EE+MPTP组阳性面密度值降低程度较SE+MPTP组减轻( $P < 0.01$ )。见图3、图5。

## 3 讨论

随着世界人口的平均寿命延长,PD的发病率较前有所增高趋势<sup>[10]</sup>。而PD的非运动症状对患者生活质量造成



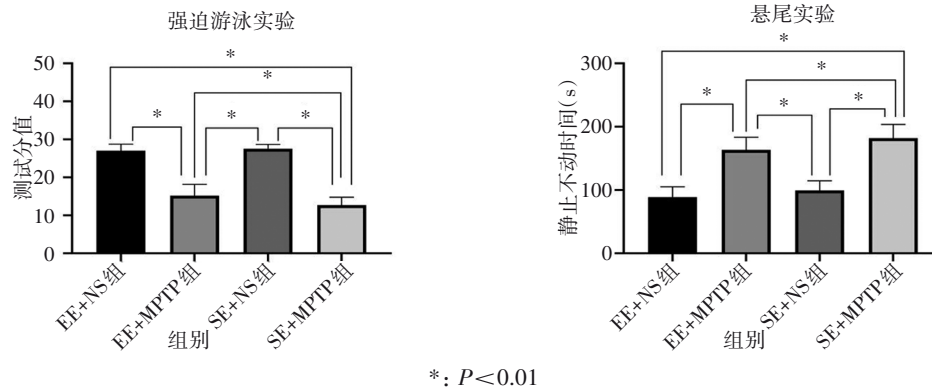


图2 各组间强迫游泳实验分值与悬尾实验中静止不动时间比较

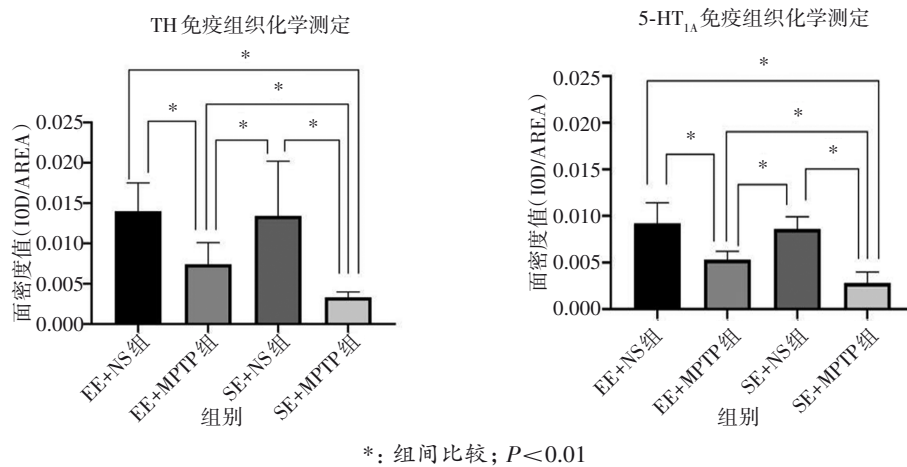
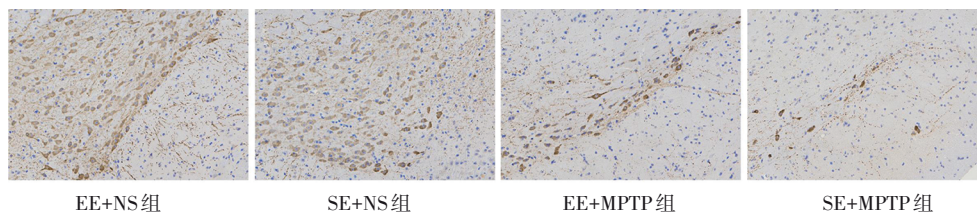
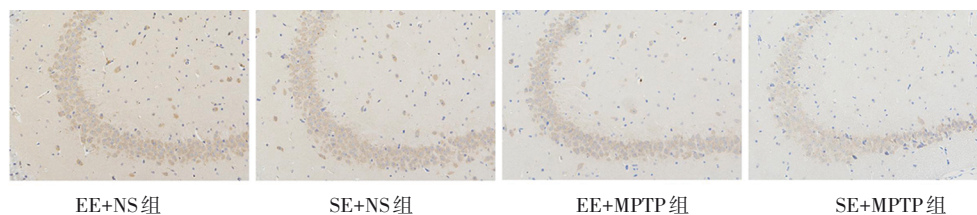
图3 各组间TH与5-HT<sub>1A</sub>免疫组织化学面密度值比较

图4 各组与EE+MPTP组黑质致密部酪氨酸羟化酶免疫组化染色(×200)

图5 各组与EE+MPTP组5-HT<sub>1A</sub>免疫组化染色(×200)

的影响更大<sup>[11]</sup>。据大量研究显示,PD合并抑郁的发病率较高而治疗率低。目前认为,PD相关抑郁与多种神经递质系统相关,包括多巴胺(dopamine, DA)、5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NA)及胆碱能系统等<sup>[12]</sup>。5-HT是一种吲哚衍生物,

在哺乳动物组织中较为丰富,尤其是大脑皮质及神经突触内,属于抑制性神经递质,对精力的恢复和情绪的调节等均有影响。5-HT产生作用必须通过相应受体的介导,已知的5-HT受体亚型有7种。5-HT<sub>1A</sub>是脑内最广泛的5-HT受体亚型,大量存在于海马、额叶皮质、中缝核、内嗅

皮质、隔核,涉及致幻行为、抑郁、焦虑以及饮食障碍多个方面的致病机制,5-HT<sub>1A</sub>介导的自我反馈调节在控制5-HT能神经传导中起重要作用,研究表明其是引起抑郁症最为重要的作用因素<sup>[13]</sup>。突触后5-HT<sub>1A</sub>受体表达下调,抑郁行为增加,而给予抗抑郁剂激活海马5-HT<sub>1A</sub>受体,则抑郁行为减少。

帕金森病相关抑郁的非药物治疗,如电休克疗法(electroconvulsive therapy, ECT)、认知行为学治疗(cognitive-behavioral therapy, CBT)及下丘脑-深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)均已在临床广泛应用,特别适用于已经产生耐药的PD伴发抑郁的患者。

丰富环境这个概念是在1947年由加拿大心理学家Donald Hebb提出的,丰富环境是一种可以提升喜悦感、运动能力以及认知能力的生活环境,在许多疾病中均起到了积极的作用,如阿尔兹海默症、脑卒中后期康复、焦虑症、抑郁症及神经病理性疼痛等。EE作为一种无创易行的治疗手段可以保护小鼠多巴胺能神经元减轻MPTP的损伤<sup>[14]</sup>,同时也可显著降低地西洋戒断模型大鼠的运动功能减退、抑郁样行为、学习记忆功能减退等神经行为缺陷<sup>[15]</sup>。EE通过增强脑源性神经营养因子突触可塑性和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,对抑郁和认知产生有益影响<sup>[16]</sup>。

在先前关于丰富环境研究的基础上,本研究再次验证了丰富环境对多巴胺能神经元具有保护作用,TH在DA的合成过程中起到了至关重要的作用,因此常被作为一种标记物来评估PD的制作成功与否<sup>[17]</sup>,与SE+MPTP组小鼠相比,EE+MPTP组小鼠的TH阳性细胞下降减少。通过从悬尾试验及强迫游泳实验的结果分析,更进一步发现丰富环境可以改善PD模型小鼠的抑郁相关行为学表现,同时在免疫组化实验表明丰富环境减轻了MPTP导致海马区5-HT<sub>1A</sub>受体的丢失,减少了PD小鼠抑郁行为的发生,从而有望延缓或阻止PD相关抑郁的发生。

综上所述,本研究有助于为PD相关抑郁的预防与治疗提供理论依据,具有重要的科学意义和临床应用前景。但丰富环境改善PD小鼠抑郁表现的相关信号通路仍有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 田径,罗晓光. 左旋多巴治疗帕金森病发生剂末现象的相关因素[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2019, 46(4): 387-390.
- [2] CUI SS, DU JJ, FU R, et al. Prevalence and risk factors for depression and anxiety in Chinese patients with Parkinson disease[J]. BMC Geriatr, 2017, 17(1): 270.
- [3] ASSOGNA F, PELLICANO C, SAVINI C, et al. Drug choices and advancements for managing depression in Parkinson's dis-

- ease[J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(4): 277-287.
- [4] DUBOVSKY SL, GHOSH BM, SEROTTE JC, et al. Psychotic depression: diagnosis, differential diagnosis, and treatment[J]. Psychother Psychosom, 2021, 90(3): 160-177.
- [5] CAO M, HU PP, ZHANG YL, et al. Enriched physical environment reverses spatial cognitive impairment of socially isolated APPswe/PS1dE9 transgenic mice before amyloidosis onset[J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24(3): 202-211.
- [6] ZAJAC MS, RENOIR T, PERREAU VM, et al. Short-term environmental stimulation spatiotemporally modulates specific serotonin receptor gene expression and behavioral pharmacology in a sexually dimorphic manner in Huntington's disease transgenic mice[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 433.
- [7] JACKSON-LEWIS V, PRZEDBORSKI S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Nat Protoc, 2007, 2(1): 141-151.
- [8] 郭德玉,于向东,陈彪,等. MPTP致C57BL/6小鼠帕金森病模型的复制及常用的行为学分析方法[J]. 实验动物科学, 2010, 27(2): 1-4.
- [9] STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice[J]. Psychopharmacology (Berl), 1985, 85(3): 367-370.
- [10] KIMPARA T, TAKEDA A. [Parkinson's disease in the oldest-old][J]. Brain Nerve, 2020, 72(12):1345-1352.
- [11] 潘晓峰,刘文娟. 普拉克索联合行为疗法对早发帕金森病合并抑郁患者HAMD UPDRS评分非运动症状及生活质量的影响[J]. 河北医学, 2019, 25(8): 1240-1243.
- [12] RYAN M, EATMON CV, SLEVIN JT. Drug treatment strategies for depression in Parkinson disease[J]. Expert Opin Pharmacother, 2019, 20(11): 1351-1363.
- [13] KOSARI-NASAB M, SHOKOUI H, AZARFARIN M, et al. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors modulate depression-related symptoms following mild traumatic brain injury in male adult mice[J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(2): 575-582.
- [14] YUAN ZY, GU P, LIU L, et al. Neuroprotective effects of enriched environment in MPTP-treated SAMP8 mice[J]. Neurosci Lett, 2009, 454(1): 6-10.
- [15] HAIDER S, NAWAZ A, BATTOOL Z, et al. Alleviation of diazepam-induced conditioned place preference and its withdrawal-associated neurobehavioral deficits following pre-exposure to enriched environment in rats[J]. Physiol Behav, 2019, 208: 112564.
- [16] SHEN J, LI YQ, QU CJ, et al. The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus[J]. J Affect Disord, 2019, 248: 81-90.
- [17] 陈天骄,冯娅,刘特,等. 漆黄素对帕金森病小鼠模型的保护作用及机制研究[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2020, 47(4): 353-357.

责任编辑:龚学民