

· 帕金森病非运动症状基础与临床研究 ·

缝隙连接蛋白 36 表达变化对帕金森病模型大鼠基底节环路功能的影响

高冕 王海雷 王烈成 陈先文

【摘要】 **目的** 观察缝隙连接蛋白 36(Cx36)在帕金森病模型大鼠纹状体和运动皮质区的表达变化,并探讨缝隙连接功能异常与帕金森病基底节环路功能紊乱间的关系。**方法** 采用 6-羟多巴胺注射法建立帕金森病动物模型,免疫组织化学染色及 Western blotting 法检测纹状体及运动皮质区 Cx36 表达变化,免疫荧光双标染色进一步分析纹状体脑啡肽阳性传出神经元及 Parvalbumin 阳性中间神经元 Cx36 表达变化。**结果** (1)免疫组织化学染色显示,帕金森病组大鼠右侧纹状体及运动皮质区 Cx36 表达水平高于正常对照组(均 $P < 0.05$)。(2)免疫荧光双标染色显示,纹状体脑啡肽阳性神经元数目和 Cx36 表达水平高于正常对照组(均 $P < 0.05$),而 Parvalbumin 阳性神经元数目和 Cx36 表达水平低于正常对照组(均 $P < 0.05$)。(3)Western blotting 法检测显示,帕金森病组大鼠右侧纹状体[(119.31 ± 8.92)%]及运动皮质区[(138.20 ± 17.88)%]Cx36 表达水平高于正常对照组[(104.05 ± 3.82)和(105.27 ± 2.82)%],均 $P < 0.05$ 。**结论** 帕金森病大鼠右侧纹状体及运动皮质区 Cx36 表达水平升高,纹状体脑啡肽阳性传出神经元 Cx36 表达上调,Parvalbumin 阳性中间神经元 Cx36 表达下调。提示缝隙连接异常可能参与帕金森病皮质-基底节-皮质环路功能紊乱的发生机制。

【关键词】 帕金森病; 基底神经节; 缝隙接合部; 连接蛋白类; 免疫组织化学; 免疫印迹法; 疾病模型,动物

Modulation of connexin 36 expression in basal ganglia and motor cortex in rat model of Parkinson's disease

GAO Mian¹, WANG Hai-lei¹, WANG Lie-cheng², CHEN Xian-wen¹¹Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui, China²Department of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui, China

Corresponding author: CHEN Xian-wen (Email: chxwmail@yahoo.com.cn)

【Abstract】 **Objective** To observe the expression of connexin 36 (Cx36) in the striatum and motor cortex of rat model of Parkinson's disease (PD) in order to explore whether gap junction is involved in the pathogenesis of the cortex-basal ganglia circuit disturbances in PD. **Methods** Hemi-parkinsonian rat model was produced by stereotaxically injecting 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to right medial forebrain bundle (MFB). Immunohistochemical staining and Western blotting analysis were used to observe the expression changes of Cx36 in the striatum and motor cortex. Double immunofluorescence labeling was used to analyze the expression of Cx36 in enkephalin (ENK) positive medium spiny neurons and Parvalbumin (PV) positive interneurons in the striatum. **Results** Immunohistochemical staining showed Cx36 expression was elevated in the right striatum as well as right motor cortex of PD group compared with normal control group ($t = 2.474, P = 0.048; t = 2.614, P = 0.040$). Double immunofluorescence labeling revealed that ENK-positive striatum neurons were elevated ($t = 3.987, P = 0.007$) and Cx36 expression was increased in ENK-positive striatum neurons ($t = 3.271, P = 0.017$) in PD group compared with normal control group. While PV-positive interneurons decreased ($t = 2.777, P = 0.032$) and Cx36

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2013.08.010

基金项目:安徽省科技计划项目(项目编号:10021303036)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院神经内科(高冕,王海雷,陈先文);230022 合肥,安徽医科大学生理学教研室(王烈成)

通讯作者:陈先文(Email:chxwmail@yahoo.com.cn)

expression was down-regulated in PV-positive interneurons ($t = 2.624, P = 0.039$) compared with the normal control group. Western blotting indicated that the 6-OHDA lesion induced a significant upregulation of Cx36 to $(119.31 \pm 8.92)\%$ in comparison with the normal group $[(104.05 \pm 3.82)\%]$ in right striatum ($t = 3.516, P = 0.024$). In right motor cortex Cx36 increased to $(138.20 \pm 17.88)\%$, induced a significant upregulation of Cx36 in the right motor cortex in comparison with the normal control group $[(105.27 \pm 2.82)\%; t = 4.068, P = 0.015]$. **Conclusion** The Cx36 expression was generally increased in the striatum and motor cortex of PD rat model, with upregulation in ENK-positive striatum neurons but downregulation in PV-positive interneurons, suggesting that gap junction dysfunction may play an important role in the disturbance of cortex-basal ganglia pathway in PD.

【Key words】 Parkinson disease; Basal ganglia; Gap junctions; Connexins; Immunohistochemistry; Immunoblotting; Disease models, animal

This study was supported by Scientific Research Plan Project of Anhui Province (No. 10021303036).

皮质-基底节-皮质环路活动紊乱与帕金森病(PD)运动障碍关系极为密切,其机制迄今尚未阐明。有研究发现,基底节神经元放电节律和同步化电活动异常在帕金森病运动功能紊乱形成机制中起重要作用^[1]。缝隙连接(GJ)是神经元同步化电活动的重要机制,基底节缝隙连接功能受多巴胺表达变化的调节^[2-5],缝隙连接功能异常可能与帕金森病基底节环路功能紊乱有关。缝隙连接蛋白(Cx)是缝隙连接的主要结构分子,其中缝隙连接蛋白36(Cx36)是神经元之间缝隙连接的主要结构蛋白^[6]。虽有研究显示,Cx36与多种神经系统疾病关系密切^[7],但其与帕金森病运动功能紊乱的关系尚不十分明确。脑啡肽(ENK)是纹状体间接通路传出神经元标志物,而小清蛋白(parvalbumin)是 γ -氨基丁酸(GABA)/Parvalbumin能中间神经元标志物。鉴于此,在本研究中我们采用Cx36与脑啡肽、Parvalbumin免疫荧光双标染色法,观察传出神经元和中间神经元Cx36表达变化,以了解缝隙连接改变发生在传出神经元还是中间神经元;同时利用免疫组织化学染色和Western blotting技术对帕金森病大鼠纹状体、运动皮质Cx36表达变化进行研究,以探讨缝隙连接功能异常在帕金森病基底节环路功能紊乱机制中的作用。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物 健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠共 59 只,体质量为 200~250 g,购自安徽医科大学实验动物中心。维持标准光照周期(12 h 光照、12 h 黑暗),自由摄食、饮水。所有大鼠共分为两组,正常对照组(对照组)19 只和帕金森病组(PD 组)40 只。

2. 试剂与仪器 (1)主要实验药品:6-羟多巴胺(6-OHDA;批号:H8523;纯度 $\geq 90\%$)、阿朴吗啡(批号:A4393;纯度 $\geq 98.50\%$)、左旋多巴(批号:D1507;纯度 $\geq 98\%$)、苜丝胍(批号:B7283;纯度 $\geq 98\%$)和维生素C(批号:A4403)均为固体粉末,购自美国Sigma公司。(2)主要试剂:免疫试剂中I抗工作液[含兔抗大鼠Cx36多克隆抗体(1:100)、小鼠抗大鼠脑啡肽单克隆抗体(1:100)、小鼠抗大鼠Parvalbumin单克隆抗体(1:1000)]分别购自美国Zymed公司、Millipore公司和Chemicon公司,通用型SP-9000免疫组织化学检测试剂盒[含生物素标记的山羊抗兔IgG II抗(1:100)和辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉菌卵白素(1:100)]、免疫试剂中II抗工作液[含异硫氰酸荧光素(FITC)绿色荧光标记的山羊抗兔IgG II抗(1:200)和四甲基罗丹明异硫氰酸(TRITC)标记的山羊抗小鼠IgG II抗(1:200)]及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。蛋白裂解液[含苯甲基磺酰氟(PMSF)]、凝胶配置试剂盒、二辛可宁酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒,以及I抗和II抗洗脱缓冲液均由江苏碧云天生物技术有限公司提供。十二烷基磺酸钠(SDS)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)均为美国Sigma公司产品。聚偏二氟乙烯(PVDF)由美国Millipore公司提供。小鼠抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。ECL化学发光试剂盒为美国Pierce公司产品。(3)主要仪器:鼠脑立体定向仪由日本Narishige公司提供。DY-11型电泳仪购自北京六一仪器厂。转膜槽购自上海天能科技有限公司。

二、实验方法

1. 帕金森病大鼠模型制备 以质量分数为10%的水合氯醛溶液(100 g/0.35 ml)腹腔注射麻醉大

鼠,按照平行头颅位固定于脑立体定向仪上,于前囟后 3.70 mm、旁开 1.90 mm 处自颅骨表面垂直进针 8.40 mm(前脑内侧束位置)注射 6-羟多巴胺 10 μ g,注射速度为 1 μ l/min。3 周后经腹腔注射阿朴吗啡(0.50 mg/kg)诱导大鼠向对侧旋转,以平均旋转次数 > 7 r/min 者视为帕金森病模型制备成功,本研究 40 只帕金森病大鼠中 19 只旋转实验显示 > 7 r/min,右侧帕金森病模型制备成功。

2. 免疫组织化学染色检测纹状体及运动皮质 Cx36 表达变化 采用免疫组织化学染色 SP 三步法进行检测。模型制备成功后 24 h 内,任意选择 7 只帕金森病模型大鼠以质量分数为 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉、0.9% 生理盐水(100 ml)经心脏灌注、4% 多聚甲醛溶液灌注固定 20 min,断头切取全脑组织,置质量分数为 4% 多聚甲醛溶液中 4 $^{\circ}$ C 过夜。切取纹状体经脱水、浸蜡、包埋等步骤制成石蜡切片,层厚 4 μ m,脱蜡至水,微波高火修复 10 min,冷却后磷酸盐缓冲液漂洗,再滴加体积分数为 3% 过氧化氢反应 15 min 以消除内源性过氧化物酶,磷酸盐缓冲液漂洗 5 min($\times 3$ 次),滴加山羊血清 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,封闭抗原,滴加兔抗大鼠 Cx36 多克隆抗体(I 抗)4 $^{\circ}$ C 过夜,滴加生物素标记的山羊抗兔 IgG II 抗,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉菌卵白素,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,DAB 显色 8 min、苏木素复染 5 min,自来水冲洗 10 min,然后 48 $^{\circ}$ C 烤片 30 min,封片。光学显微镜观察,以胞膜呈棕黄色为阳性细胞。切取前囟前后各 1 mm 之间共计 5 张冠状位脑组织切片(不同动物切片层面相同),每张切片随机在壳核和运动皮质区各选择 10 个高倍视野(HPF)进行阳性细胞计数;Image-Pro Plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司)进行图像分析,检测 Cx36 平均光密度(OD)值,并行半定量分析(光密度值/检测区域面积)。

3. 免疫荧光双标法检测纹状体 Cx36 与脑啡肽、Parvalbumin 共表达变化 模型制备成功后 24 h 内,任意选择 7 只帕金森病模型大鼠同法处死,切取右侧脑组织,连续冠状切片,层厚 10 μ m(组织切片层面坐标为前囟后 2~5 mm),以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗、山羊封闭血清封闭 1 h,滴加兔抗大鼠 Cx36 多克隆抗体(I 抗)和小鼠抗大鼠脑啡肽抗体(I 抗)或小鼠抗大鼠 Parvalbumin 抗体(I 抗),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;经磷酸盐缓冲液漂洗后滴加荧光标记的

山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG II 抗(1:100),37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min,冲洗后抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜下观察并计数阳性细胞数目。Cx36 阳性细胞之胞膜呈绿色荧光,脑啡肽和 Parvalbumin 阳性细胞则胞质呈红色荧光。

4. Western blotting 法检测 Cx36 表达变化 对照组和帕金森病组各选择 5 只大鼠,以质量分数为 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉、0.9% 的生理盐水(100 ml)经心脏灌注,断头处死动物,迅速切开颅骨、冰上剥取双侧纹状体及运动皮质区。每 100 mg 脑组织中加入 1 ml 蛋白裂解液(含 10 μ l PMSF),提取总蛋白并测定蛋白质含量,滴加 5 \times SDS 上样缓冲液,金属浴 10 min 变性。蛋白质样本(80 μ g)经体积分数为 12% 的 SDS-PAGE 分离后,经电转膜仪转至 PVDF 膜,以含质量分数为 5% 脱脂奶粉的洗脱缓冲液室温封闭 2 h,再滴加兔抗大鼠 Cx36 多克隆抗体(1:150),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 缓冲液冲洗 10 min($\times 3$ 次),滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:15 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,然后 TBST 缓冲液冲洗 10 min($\times 3$ 次),孵育 1 min,ECL 显色,曝光后显影、定影。同一张 PVDF 膜上滴加 I 抗和 II 抗洗脱缓冲液,摇床漂洗 5 min,蒸馏水冲洗 5 min,以含质量分数为 5% 脱脂奶粉的洗脱缓冲液室温封闭 1 h,滴加小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体(1:250),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG II 抗(1:15 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;冲洗后移入 ECL 显色液,曝光后显影、定影。以 β -actin 作为内参照物,扫描并采用 Quantity One 4.62 统计软件进行图像分析,测量光密度值,以 Cx36/ β -actin 获得相对表达量,并以右侧(毁损侧)/左侧(未毁损侧)消除大鼠个体差异。

三、统计分析方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据计算与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,免疫组织化学染色和 Western blotting 检测结果采用两独立样本的 t 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、免疫组织化学染色观察纹状体及运动皮质区 Cx36 表达变化

与正常对照组相比,纹状体 Cx36 阳性细胞主要集中在内侧和腹侧,环绕细胞膜进行表达。半定量

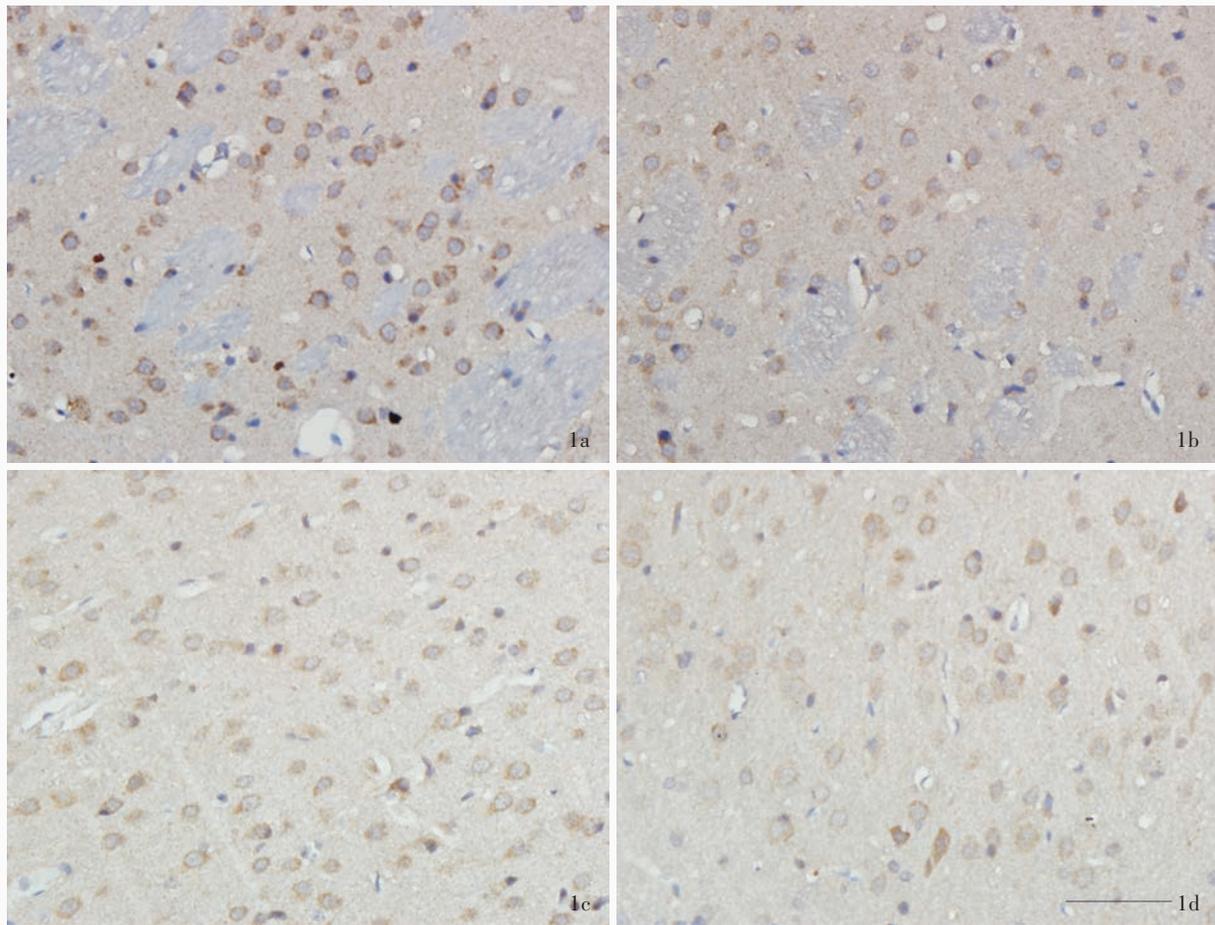


图 1 光学显微镜观察右侧纹状体和运动皮质区 Cx36 表达变化 免疫组织化学染色(SP 三步法) ×200 1a 帕金森病组大鼠右侧纹状体 Cx36 阳性细胞数目增加 1b 对照组大鼠右侧纹状体 Cx36 阳性细胞数目较少 1c 帕金森病组大鼠右侧运动皮质区 Cx36 阳性细胞数目增加 1d 对照组大鼠右侧运动皮质区 Cx36 阳性细胞数目较少

Figure 1 Expression change of Cx36 in right striatum and motor cortex. Immunohistochemical staining (SP 3-step method) ×200 Cx36-positive cells increased in right striatum of PD group rats (Panel 1a). Cx36 in right striatum of normal control group rats (Panel 1b). Cx36-positive cells increased in right motor cortex of PD group rats (Panel 1c). Cx36 in right motor cortex of normal control group rats (Panel 1d).

表 1 帕金森病组与正常对照组大鼠右侧纹状体和运动皮质区 Cx36 表达水平的比较(̄x ± s)

Table 1. Comparison of the expression of Cx36 in the right striatum and motor cortex of rat model between PD group and control group (̄x ± s)

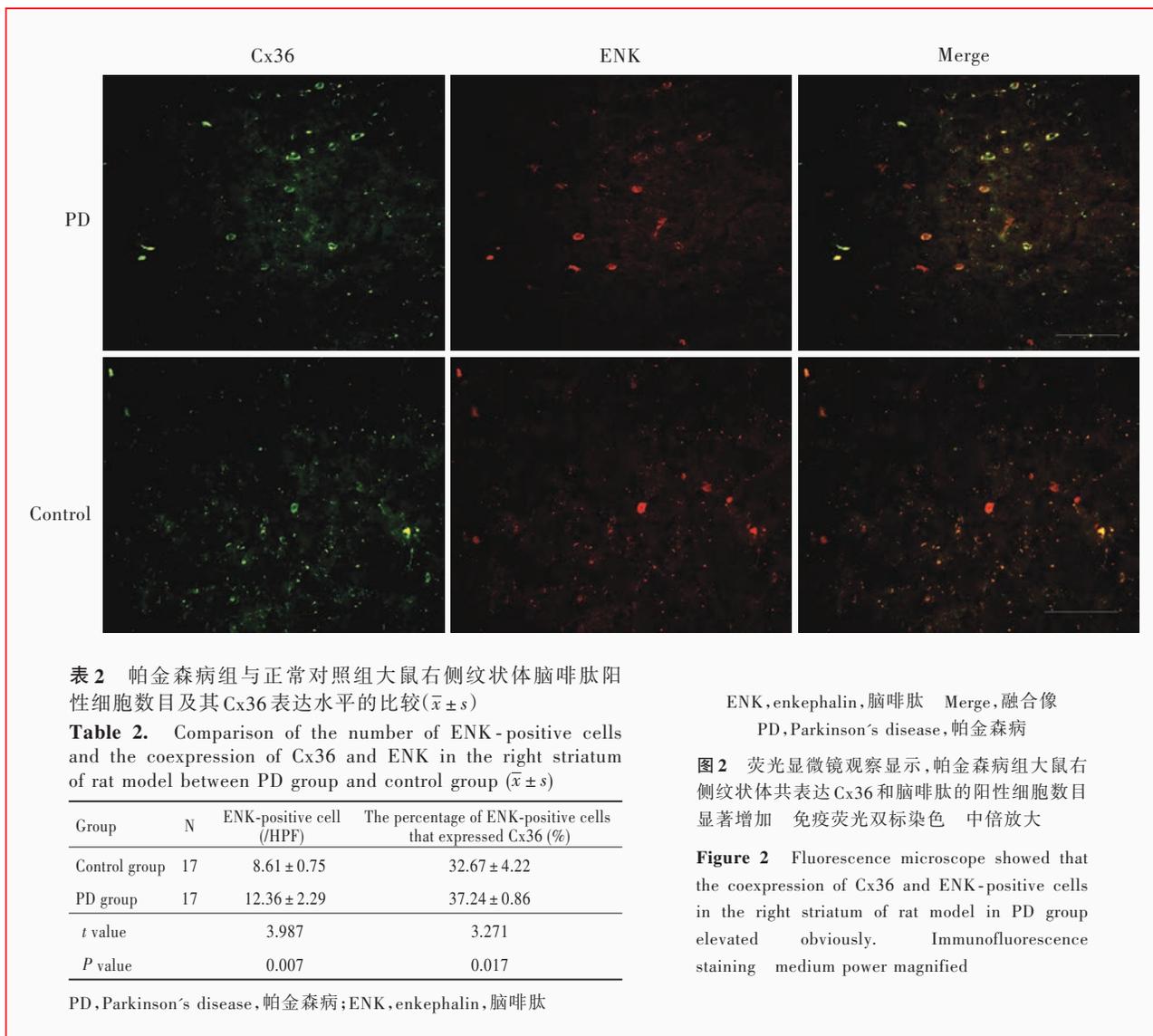
Group	N	Right striatum		Right motor cortex	
		Cx36-positive cell (/HPF)	OD value	Cx36-positive cell (/HPF)	OD value
Control group	7	23.78 ± 5.67	0.18 ± 0.02	24.13 ± 3.44	0.19 ± 0.07
PD group	7	32.88 ± 7.91	0.22 ± 0.03	30.02 ± 4.87	0.21 ± 0.01
t value		2.474	2.935	2.614	0.748
P value		0.048	0.026	0.040	0.483

PD, Parkinson's disease. 帕金森病

分析显示, 帕金森病组大鼠右侧纹状体和运动皮质区 Cx36 阳性细胞数目增加(均 $P < 0.05$), 右侧纹状体 Cx36 平均光密度值增加($P < 0.05$), 但运动皮质区 Cx36 平均光密度值与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$; 图 1, 表 1)。

二、免疫荧光双标染色观察右侧纹状体共表达 Cx36 和脑啡肽或 Parvalbumin 变化

与正常对照组相比, 帕金森病组大鼠右侧纹状体脑啡肽阳性细胞数目增加($P < 0.01$), 提示纹状体传出神经元脑啡肽表达水平升高, 同时, 共表达



Cx36 和脑啡肽的阳性细胞比例增加 ($P < 0.05$; 图 2, 表 2); 右侧纹状体 Parvalbumin 阳性细胞数目减少 ($P < 0.05$), 共表达 Cx36 和 Parvalbumin 的阳性细胞比例亦随之下降 ($P < 0.05$; 图 3, 表 3)。

三、Western blotting 法检测右侧纹状体及运动皮质区 Cx36 表达变化

与正常对照组相比, 帕金森病组大鼠右侧纹状体和运动皮质区 Cx36 表达水平升高 (均 $P < 0.05$; 图 4, 表 4)。

讨 论

有研究显示, 帕金森病基底节环路功能紊乱不仅表现在基底节抑制性输出增加, 更重要的是神经元放电模式及同步化电活动改变^[1]。鉴于缝隙连接是神经元同步化电活动的重要机制, 推测缝隙连接

功能异常可能参与基底节神经元电活动紊乱的机制。Cx36 是神经元间缝隙连接的主要结构蛋白, 广泛分布于脑组织, 在基底节主要分布于纹状体^[8]。本实验免疫组织化学染色及 Western blotting 检测结果均显示, 帕金森病组大鼠右侧纹状体及运动皮质区 Cx36 表达水平升高, 提示神经元缝隙连接功能改变可能参与了帕金森病皮质-基底节-皮质环路电活动紊乱的形成机制。

基底节神经元之间的缝隙连接主要存在于纹状体, GABA/Parvalbumin 阳性中间神经元之间通过丰富的缝隙连接构成同步化活动网络, 对纹状体传出神经元具有调节作用。GABA/Parvalbumin 阳性中间神经元的抑制作用极为强大, 其功能可能是抑制背景噪音, 选择性锐化皮质至特定纹状体传出神经元的有效输入, 亦可能是控制特定纹状体传出神

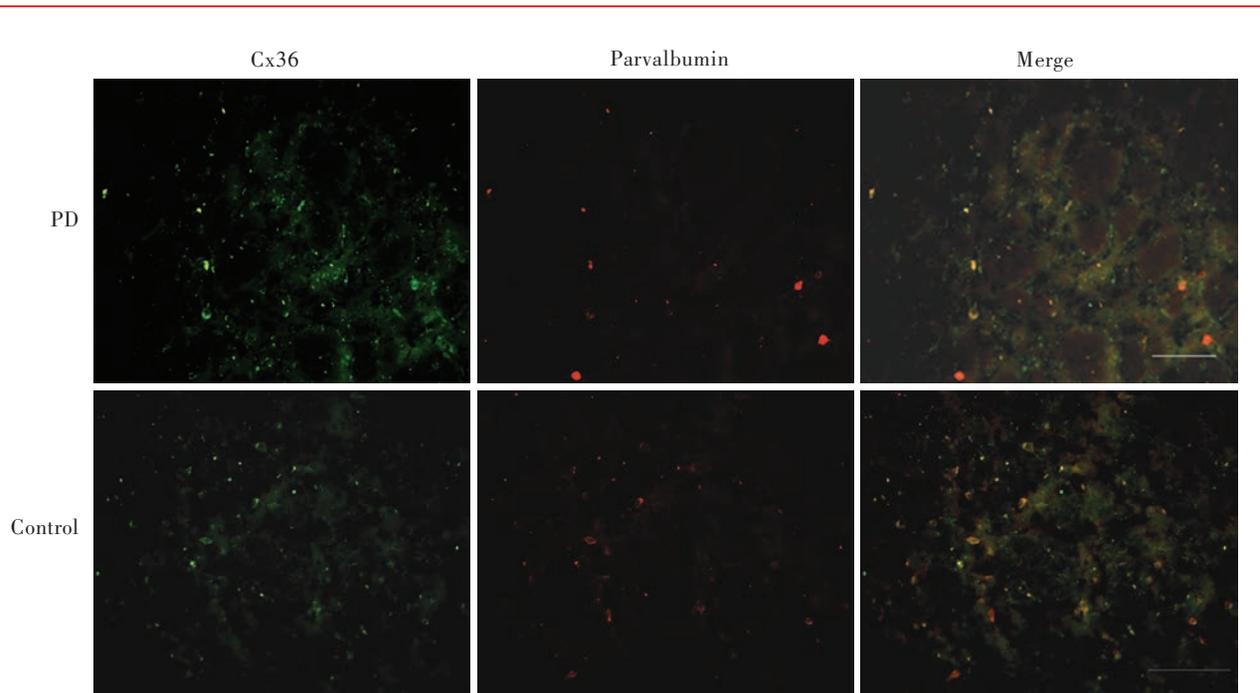


表 3 帕金森病组与正常对照组大鼠右侧纹状体 Parvalbumin 阳性细胞数目及其 Cx36 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Comparison of the number of Parvalbumin-positive cells and the coexpression of Cx36 and Parvalbumin in the right striatum of rat model between PD group and control group ($\bar{x} \pm s$)

Group	N	Parvalbumin-positive cell (HPF)	The percentage of Parvalbumin-positive cells that expressed Cx36 (%)
Control group	17	19.61 ± 2.32	40.43 ± 2.30
PD group	17	14.51 ± 4.24	31.92 ± 5.68
t value		2.777	2.624
P value		0.032	0.039

PD, Parkinson's disease, 帕金森病

PD, Parkinson's disease, 帕金森病
Merge, 融合像

图 3 荧光显微镜观察显示, 帕金森病组大鼠右侧纹状体共表达 Cx36 和 Parvalbumin 的阳性细胞数目明显减少。免疫荧光双标染色 中倍放大

Figure 3 Fluorescence microscope revealed that the coexpression of Cx36 and Parvalbumin - positive cells in the right striatum of rat model in PD group reduced obviously. Immunofluorescence staining medium power magnified

神经元兴奋的时点^[9-10]。此外, 缝隙连接也存在于纹状体中型棘状传出神经元之间^[2]。为进一步分析帕金森病组大鼠右侧纹状体不同类型神经元 Cx36 表达变化, 我们采用免疫荧光双标染色对 Cx36 在 GABA/Parvalbumin 阳性中间神经元及脑啡肽阳性传出神经元的表达变化进行观察。结果显示, 脑啡肽表达阳性的纹状体传出神经元 Cx36 表达水平显著升高, 而 GABA/Parvalbumin 表达阳性的中间神经元 Cx36 表达水平则明显降低。提示帕金森病大鼠右侧纹状体传出神经元和中间神经元缝隙连接均发生异常改变, 这一改变可能与帕金森病大鼠间接通路活动增强有关。至于脑啡肽阳性传出神经元及 GABA/Parvalbumin 阳性中间神经元 Cx36 表达改变对基底节神经元电活动的影响, 尚待进一步研究。在本研究中, 我们还观察到帕金森病组大鼠右

侧纹状体脑啡肽表达阳性的传出神经元数目增加, 表明脑啡肽表达水平上调, 与以往的研究结果相一致。此外, 我们还发现帕金森病组大鼠右侧纹状体 Parvalbumin 表达阳性的中间神经元数目减少, 这一结果鲜见文献报道, 但有文献显示, 采用 6-羟多巴胺制备的帕金森病大鼠模型其苍白球外侧部(Gpe) Parvalbumin 阳性神经元数目显著减少^[3]。

目前, 关于帕金森病大鼠纹状体及运动皮质区 Cx36 表达改变的机制尚不十分清楚。有研究显示, 纹状体缝隙连接功能受多巴胺调节, 例如损毁黑质造成多巴胺严重缺乏可显著提高纹状体神经元的染料耦合比例^[4-5], 应用具 D2 受体拮抗作用的传统抗精神病药物氟哌啶醇亚急性处理即具有类似作用, 而新型抗精神病药物氯氮平(作用于 D4 受体)则无此作用^[11]。多巴胺受体激动药阿朴吗啡引起的

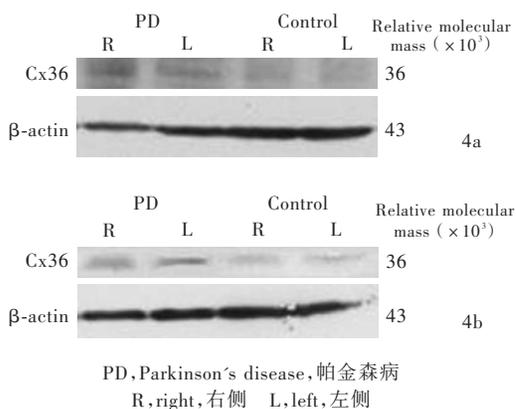


图 4 Western blotting 法检测所见 4a 帕金森病组大鼠右侧纹状体 Cx36 表达水平显著升高 4b 帕金森病组大鼠右侧运动皮质区 Cx36 表达水平显著升高

Figure 4 Western-blotting of Cx36 in the right striatum and motor cortex (R: right side, L: left side). Cx36 expression levels increased obviously in the right striatum of rat model in PD group (Panel 4a). Cx36 expression levels increased obviously in the right motor cortex of rat model in PD group (Panel 4b).

表 4 帕金森病组与正常对照组大鼠右侧纹状体和运动皮质区 Cx36 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 4. Comparison of the expression of Cx36 in the right striatum and motor cortex of rat model between PD group and control group ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	N	Expression of Cx36 in right striatum	Expression of Cx36 in right motor cortex
Control group	17	104.05 ± 3.82	105.27 ± 2.82
PD group	17	119.31 ± 8.92	138.20 ± 17.88
t value		3.516	4.068
P value		0.024	0.015

PD, Parkinson's disease, 帕金森病

刻板行为可被缝隙连接阻断药所抑制,提示缝隙连接参与多巴胺能受体介导的行为反应^[12]。由 Cx36 组成的缝隙连接是多巴胺能神经元之间耦联的常见形式^[13],因此,我们推测多巴胺缺失除可影响缝隙连接功能外,也会影响结构蛋白 Cx36 的表达。

已有实验从缝隙连接蛋白家族的其他连接蛋白如 Cx43^[14]研究缝隙连接与帕金森病间的关系。而 Cx36 为一具有创新性的研究方向,以探讨缝隙连接功能异常在帕金森病基底节环路功能紊乱机制中的作用。虽然我们的研究小组在此方面已取得了一些阳性结果,但仍存在不足:(1)缝隙连接蛋白是一种蛋白复合体,同一缝隙连接子可由不同种类的缝隙连接蛋白构成。单纯观察 Cx36 的作用机制,不能完全证明介导细胞间通讯的缝隙连接功能异

常与帕金森病发病机制的关系,尚需更为广泛的实验对象。(2)Western blotting 法仅能对 Cx36 进行总蛋白水平的定量检测,未行磷酸化 Cx36 检测,无法得知帕金森病大鼠基底节 Cx36 磷酸化修饰的改变,需在以后的工作中进一步完善。(3)采用 Western blotting 法和免疫组织化学染色观察到帕金森病大鼠右侧纹状体和运动皮质区 Cx36 表达水平上调,但基底节环路中的互相调节作用是否会引起该环路中各部位 Cx36 表达水平的改变,尚待进一步论证。

参 考 文 献

- [1] Brown P. Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2003, 18:357-363.
- [2] Venance L, Glowinski J. Heterogeneity of spike frequency adaption among medium spiny neurons from the rat striatum. *Neuroscience*, 2003, 122:77-92.
- [3] Fernández-Suárez D, Celorrio M, Lanciego JL, Franco R, Aymerich MS. Loss of parvalbumin-positive neurons from the globus pallidus in animal models of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2012, 71:973-982.
- [4] Cepeda C, Walsh JP, Hull CD, Howard SG, Buchwald NA, Levine MS. Dye-coupling in the neostriatum of the rat. I: modulation by dopamine-depleting lesions. *Synapse*, 1989, 4:229-237.
- [5] Onn SP, Grace AA. Alterations in electrophysiological activity and dye coupling of striatal spiny and aspiny neurons in dopamine-denervated rat striatum recorded in vivo. *Synapse*, 1999, 33:1-15.
- [6] Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Kamasawa N. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci*, 2001, 21:1983-2000.
- [7] Dere E, Zlomuzica A. The role of gap junctions in the brain in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36:206-217.
- [8] Condorelli DF, Belluardo N, Trovato - Salinaro A, Mudò G. Expression of Cx36 in mammalian neurons. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 32:72-85.
- [9] Mascagni F, McDonald AJ. Parvalbumin-immunoreactive neurons and GABAergic neurons of the basal forebrain project to the rat basolateral amygdale. *Neuroscience*, 2009, 160:805-812.
- [10] Tepper JM, Wilson CJ, Koose T. Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Res Rev*, 2008, 58:272-281.
- [11] O'Donnell P, Grace AA. Different effects of subchronic clozapine and haloperidol on dye-coupling between neurons in the rat striatal complex. *Neuroscience*, 1995, 66:763-767.
- [12] Moore H, Grace AA. A role for electrotonic coupling in the striatum in the expression of dopamine receptor-mediated stereotypies. *Neuropsychopharmacology*, 2002, 27:980-992.
- [13] Vandecasteele M, Glowinski J, Venance L. Connexin mRNA expression in single dopaminergic neurons of substantia nigra pars compacta. *Neurosci Res*, 2006, 56:419-426.
- [14] Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, Ohta S. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2009, 160:61-68.

(收稿日期:2013-06-10)