

帕金森病回顾与展望

梁希彬 罗涌 李丰桥 王晓民*

(北京大学神经科学研究所, 北京 100083. * 联系人)

摘要 越来越多的资料显示帕金森病已经成为严重危害中老年人健康的神经系统疾病之一, 正引起世界各国神经科学工作者的高度重视. 近年来, 临床和基础研究方面取得了一些令人鼓舞的成就. 诸如涉及本病遗传基因的定位、早期诊断技术、神经保护治疗、细胞和基因治疗等均有较大的发展, 为人类认识和防治此类疾病展现了良好的前景.

关键词 帕金森病 病因学 诊断 治疗

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是以震颤、肌肉僵直、运动迟缓等一系列症状为临床特征的中枢神经退行性疾病. 其主要病理改变为中脑黑质多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性坏死和病人脑内 Lewy 小体(Lewy's body, LB)的形成. 随着人口平均寿命延长和老龄化出现, PD 的发病率呈现了明显上升势头. 一项最近的统计资料显示 PD 的发病率占总人口的 0.2%, 而在 55 岁以上人口中占 1.4%, 在 75 岁以上人口中占 3.4%^[1]. 因此, 引起了世界各国的广泛重视, 纷纷斥资进行研究. 目前已经发现了与 PD 发病相关的 3 个基因分别位于人类第 4, 6, 2 号染色体上, 并发现了一些与 PD 发病相关的易感基因. 同时, 运用脑成像技术对此病进行早期诊断也已经初见成效. 以神经保护为主旨的各种治疗方法的研究进展为防治该病提供了希望. 细胞和基因治疗技术不断发展和完善, 为彻底治疗该病展现了良好的前景.

1 病因学

PD 病因学的研究主要是围绕遗传因素还是环境因素致病进行了讨论. 遗传学说的主要依据是确立了 3 个与家族性 PD 有关的致病基因. 第 1 个致病基因位于第 4 号染色体 q21-q23 的位置, 该突变基因为 α -Synuclein^[2]. 此基因第 209 位的核苷酸发生了 G-A 错义突变, 使其蛋白质第 53 位的丙氨酸(Ala)变成了苏氨酸(Thr). 免疫组化研究发现 α -Synuclein 在 PD 患者的 LB 内大量分布, 表明它可能在 PD 发生中起着重要作用. 第 2 个与 PD 有关的基因首先在日本一个常染色体隐性遗传性早发型 PD (autosomal recessive juvenile parkinsonism, ARJP)家族中发现. 该致病基因定位于第 6 号染色体 q25.2~q27, 位于遗传标记 D6S305 和 D6S253 之间^[3]. 该基因由 2 960 个核苷酸构成, 含有一个 1 395 个碱基的开放阅读框架, 编码一个 465 个氨基酸的蛋白质, 这个蛋白质现定名为 parkin. 它在人体许多组织内存在, 功能不详. 第 3 个与 PD 相关的致病基因定位于第 2 号染色体 2P13 上, 命名为 Park3^[4]. 目前对 Park3 的研究不多, 也未能找到致突变的基因. 这 3 个与 PD 相关的遗传致病基因的确立为 PD 的遗传致病学说奠定了基础. 但需要指出的是, 许多后续的研究未能在 PD 患者中发现与上述基因相同或相似的变异, 因此在大范围内确定原发性 PD 的遗传致病基因尚有许多工作要做.

多年来, 环境毒素诱发 PD 一直是人们感兴趣的课题. 1983 年, 美国加州一群吸食了不纯的海洛因的青年人相继出现 PD 症状, 经分析后确定这种海洛因中含有的一种名为 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四羟吡啶(1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP)的物质是导致本病发生的元凶^[5]. 这无疑强烈支持了外界环境因素诱发 PD 的假说. 许多研究者认为 PD 可能

正是由于自然界中存在的类似于 MPTP 的物质引起的. 目前研究证实, 许多植物、食物、农药和杀虫剂中含有与 MPTP 类似的、可以造成 DA 能神经元死亡的物质^[6]. 但这些发现只能解释部分病例, 对于多数同样接触这些毒性物质的人却未出现 PD 这一事实不能给予解释. 于是越来越多的研究者倾向于认为, 病人对 PD 的遗传易感性与 PD 发生有直接的关系.

对 PD 的遗传易感性基因的研究主要集中于细胞色素 P450 酶族的 2D6 异构酶(CYP2D6)和谷胱甘肽硫基转移酶(glutathione S-transferase, GSTM1)基因突变方面. 有报道认为这两种酶中任何一种基因发生变异, 都会引起 PD 发病率的上升. 而当二者皆有突变时, PD 患病的危险性高出常人患病率的 10~14 倍^[7].

目前, 任何单一的因素都难以解释 PD 的发病. 遗传因素在少数早发的 PD 患者中可能起一定作用. 散发的 PD 与环境因素有关, 尤其在 50 岁以后发病的患者中更为明显. 病人体内与生俱来的线粒体和一些酶的缺陷使其对内外环境毒素具有高度的易感性, 与 PD 的发生有直接的关系. 此外, 年龄也是 PD 发生的重要因素之一.

2 分子神经病理学

PD 典型的特征 LB 的出现. LB 位于神经元胞体内, 呈球形. 电子显微镜下可见在其周围有放射状排列的疏松的细丝包裹. LB 的主要结构是 7~25 nm 直径的纤维丝, 用免疫组化分析其组成, 发现了 3 种主要成分, 即: α -synuclein 蛋白、神经纤维丝蛋白和泛素蛋白^[8]. 分析 LB 内细胞骨架和非细胞骨架蛋白发现了 4 种成分: 分别为 LB 纤维丝; 与 LB 形成相关的细胞应答蛋白; 可调节 LB 纤维丝的酶如激酶和磷酸酶; 参与包涵体形成的细胞溶性蛋白. 由于无法从死后的 PD 病人中获得足够的纯 LB, 因此尚难以对 LB 的生化组成进行精确定论.

3 发病机制

(1) 氧化应激. 氧化应激被认为是 PD 患者黑质神经元死亡的主要因素. DA 在氧和水的存在下, 受单胺氧化酶作用生成过氧化氢、醛和氨. 过氧化氢可导致毒性自由基增加, 于是诱发氧化应激反应^[9]. 自由基对神经元的损害主要表现在如下几方面: 细胞膜发生脂质过氧化反应, 膜磷脂被破坏降解; 细胞膜对钠、钙及大分子物质通透性增加, 神经元发生细胞毒性水肿; 线粒体破坏, 功能丧失.

(2) 兴奋性神经毒性. 作为兴奋性氨基酸, 谷氨酸主要通过其离子型的 NMDA 和 AMPA 受体对 DA 能神经元产生影响. NMDA 受体多数存在于由皮质到纹状体的投射神经元中. 而 AMPA 受体多存在于底丘脑核、苍白球内、外侧部等核团中. 兴奋性神经毒性发生的机制是由于 NMDA 受体被活化后, 引起了广泛的 Ca^{2+} 内流以及 Ca^{2+} 在线粒体内快速的堆积, 导致线粒体功能丧失. NMDA 受体的兴奋还可增加一氧化氮合酶的活性, 使 NO 合成增加导致神经细胞的毒性作用^[10]. 此外, 谷氨酸的毒性与引发 PD 的其他机制如线粒体 DNA 缺陷、过多的自由基形成和 GSH(还原型谷胱甘肽)耗竭等有关, 其中任一环节的失常都可引起神经元的损伤和死亡.

(3) 线粒体的损伤. 线粒体是细胞能量产生的初级场所. 毒性物质可以通过抑制线粒体复合物 I 来影响线粒体呼吸链导致 ATP 产生减少, 最终导致细胞因能量耗竭而死亡^[11]. 1-甲基-4 苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺)也可以导致复合物 I 失电子, 使其产生过氧化物. 另外, 通过对位于第 18 号染色体 P11.3 上编码复合酶 I 黄素蛋白区亚单位(它是与

NADH 发生作用的最主要的亚单位之一)的基因多态性分析发现,在 PD 病人这一基因的信号肽上发生了 C-T 置换,使得第 29 位上的丙氨酸变成了缬氨酸。据统计,带有这种突变基因的人发生 PD 的危险系数大大上升^[12]。

(4) 多巴胺转运体和囊泡转运体。对于多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)和囊泡转运体(vesicular monoamine transporter, VMAT2)在 PD 发病中作用的认识始于近几年^[13]。研究发现,DA 在代谢过程中可以产生自由基等一系列毒性物质,通过 DAT 的介导造成了对 DA 能神经元的损伤^[14]。DAT 位于神经元的细胞膜上,它可以将毒性物质转运到胞浆中从而对神经元构成损害,而 VMAT2 可以将位于胞浆中的这些毒性物质转运入囊泡中,进而减少这些物质的毒性作用。两者相互配合来调节位于胞浆和囊泡中毒性物质的浓度。实验发现, DAT 过表达的转基因小鼠对 MPTP 毒性的易感性增高。而在通过基因敲除技术建立的只能表达半数的 DAT 的小鼠中,相同剂量的 MPTP 对其体内 DA 能神经元的毒性作用却下降了一半^[15]。将 VMAT2 的 2 个拷贝基因完全敲除,小鼠在出生后数天便死亡。只敲除单拷贝的基因并表达正常水平半数的 VMAT2 蛋白的小鼠能够存活,但用 MPTP 诱导的 DA 能神经元死亡的数量却增加了 1 倍^[16]。说明 DAT 和 VMAT2 的表达水平与 DA 神经元的死亡有直接的关系。

此外,有研究表明免疫炎症反应和细胞凋亡在 PD 的发病中也起着一定的作用。因此,PD 中细胞死亡可能通过多个机制产生。它们之间并非孤立的,而是相互关联、相互影响。氧化应激可以导致兴奋性神经毒性,后者又可以引起线粒体的损伤,反之亦然。了解上述各种机制之间的相互作用,将有助于我们进一步了解 PD 细胞死亡的机制。

4 早期诊断

由于缺乏可靠的理化指标,目前对于 PD 的诊断往往依靠医生的经验和病人的症状来做出。即使建立了最严格的诊断标准,其准确率也只有 75%,因此建立明确的客观诊断标准对于确立诊断、评价疗效和疾病的进展有重要的参考价值。事实上,病人出现明显的症状时绝大多数 DA 能神经元已经死亡,后续的治疗便相当棘手。因此建立本病的早期诊断是预防和控制本病的最有效的措施之一。研究发现当 DA 能神经元末梢受到刺激时,DA 自突触前膜的囊泡内释放到突触间隙并作用于突触后膜相应的 DA 受体。此时,位于突触前膜的 DAT 也变活跃并将 DA 重新摄取到突触前膜内。当 DA 能神经元丢失后, DAT 和 DA 受体均会出现一系列的改变。借助脑成像技术显示纹状体内 DAT 和 DA 受体(主要是 D₂受体)的改变,可以形象地反映 PD 病人 DA 能系统损伤程度,为 PD 的早期诊断提供参考。

(1) 用单光子发射计算机断层扫描(single photon emission computed tomography, SPECT)研究 DAT 在纹状体内的分布。DA 释放至突触间隙后,可引起突触后膜的 DA 受体发生改变,同时也向位于突触前膜的 DAT 发出指令回收释放到突触间隙的 DA。因此, DAT 的变化要比受体的变化更为敏感、直接。将放射性标记的配体注入体内,配体可与 DAT 结合并在 SPECT 上显示出 PD 病人纹状体内 DAT 的功能和密度的变化,成为反映 DA 递质系统功能的重要指标。目前,比较成功的 DAT 放射性标记的配体示踪剂是 β -CIT(2- β -carbomethoxy-3- β -4-iodophenyl- tropane)和其衍生物 FP-CIT 等^[17, 18]。它们在脑内代谢稳定且具有较低的非特异性结合。比较 β -CIT 与 FP-CIT 与 DAT 的亲合速度发现,前者在注射后 24 h 出现特异性的结合而后者仅需 3 h。用 ¹²³I- β -SPECT 技术研究早期和晚期 PD 病人脑内 DAT 的变化,发现在早期

PD 患者的尾核区 DAT 变化与对照组无差别,但在晚期 PD 患者的在尾核区差别显著;在早期与晚期 PD 病人的壳核 DAT 均有所下降^[19].这一发现与病理解剖证实的 PD 病人壳核内 80% 的 DA 下降而在尾核内仅仅有 40% 的 DA 下降相一致^[20].据此可区分早、晚期 PD 病人或用于 PD 病的早期诊断. SPECT 由于费用低廉、普及率高已经得到较为广泛的应用.其缺点是图像空间分辨率差,难以建立定量参数.

(2) 用正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)技术研究 ^{18}F -DOPA 在纹状体内的分布变化. PET 扫描得到的是一种局部放射性活性浓度的提成图像,是目前活体研究黑质纹状体系统最好的方法.其突出优点是空间分辨率和探测效率高,能准确显示受检脏器示踪剂的浓度并提供各种定量参数. ^{18}F -DOPA 是经典的突触前示踪剂,它可选择性地聚积在纹状体区的 DA 能末梢,可用它来反映黑质纹状体神经末梢密度和芳香族氨基酸脱羧酶的活性.但在早期的 PD 病人中,用 PET 检测到的 ^{18}F -DOPA 积聚下降的程度较 SPECT 检测到的 DAT 降低的程度低^[21].因此用于 PD 早期诊断不如 SPECT 敏感.在中、晚期 PD 病人中, PET 可以检测到病人壳核内 ^{18}F -DOPA 摄取明显降低.

必须指出的是,上述检查只能作为辅助诊断手段.由于黑质-纹状体 DA 能系统具有复杂的生理和病理特征,影响影像形成的因素众多.因此,对于异常图像的认定必须结合临床病人的具体情况进行综合分析,才能作出正确的诊断.

5 新的治疗药物

传统的以 L-DOPA 为主的治疗药物对 PD 的早期有一定的治疗作用,但无法阻止本病的进展.于是研究重点转移到了使用神经营养和抗凋亡类药物上,以期能够最大限度地保护剩余的 DA 能神经元免于进一步死亡.

(1) 神经营养因子.已经发现许多对体内和体外培养的 DA 能神经元有营养作用的神经营养因子.包括:神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经营养因子 4 / 5 (neurotrophin-4/5, NT-4/5)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、neurturin(NTN)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth neurotrophic factor)和转化生长因子- β (transforming growth factor- β)等^[22, 23].其中 GDNF 的作用最受关注.最近有研究者将 GDNF 每月 1 次注入一个 65 岁 PD 病人的脑室内,试图阻止其病情的逐渐加重,但未能奏效,也未发现有任何黑质纹状体神经元恢复的迹象^[24].尽管如此,这一尝试为用神经营养因子治疗 PD 迈出了第一步.今后应当探索一种更为合理的 GDNF 给药途径和选择病程较短的病人进行治疗研究.

(2) 神经营养型药物.包括免疫菲林(immunophilin)的配体,如环孢菌素 A(CsA)和 FK506 等. CsA 和 FK506 为目前临床应用的两种主要的免疫抑制剂,用于器官移植,可抑制免疫排斥反应,提高移植成功率.近年来的研究发现, CsA 和 FK506 的受体-免疫菲林在脑内大量存在,尤其在神经损伤时能够急剧上调.体内外研究均显示, FK506 及其人工合成的结构拟似物对多种神经元(包括 DA 能神经元)有促进轴突生长和神经保护作用^[25].目前,针对免疫菲林构效关系的药物设计已成为治疗 PD 药物研究的新热点.

(3) 抗凋亡的药物.对于 DA 能神经元凋亡的细胞内机制特别是线粒体功能的认识为人

们提供了新的治疗靶点. 线粒体复合酶-I 功能的缺陷使得 DA 能神经元对一系列导致细胞损伤的因素更加敏感. 线粒体巨通道(mitochondrial megachannel)的开放是导致细胞损伤的因素之一. 因此, 直接开发出关闭线粒体巨通道的药物或阻断凋亡-诱发因子的释放是药物研究的另一重要方向^[26].

6 新的外科手术疗法

目前, 传统的手术疗法如苍白球切除术、丘脑切除术仍在 PD 外科治疗中扮演角色. 进入 90 年代以来, 国外建立的一种以微电极定位、计算机控制的新的立体定向损毁疗法, 在治疗晚期 PD 患者中取得了巨大的成功. 这种建立在现代电生理学技术上, 在细胞水平精确定位定向手术治疗 PD 的技术, 可以识别 PD 病人脑内核团细胞的特异性放电, 故在细胞水平确定靶点, 克服了个体在解剖和功能上的变异, 使手术更加安全有效. 苍白球不同的部位具有明显不同的放电特征, 如在苍白球外侧部具有相对不规律的或短暂爆发式放电, 而苍白球内侧部具有相对持续的高频放电. 丘脑的 VIM 及其周围结构也有明显不同的电生理特征^[27]. 通过这些不同结构的辨认, 可以来指导定位. 其定位的精确性明显优于 CT(计算机断层扫描)和 MRI(核磁共振成像系统), 并且克服了由于个体差异带来的偏差, 为安全地实施这种手术提供了保证. 但这种手术并非适用于所有的 PD 病人, 一般对于原发性 PD 或经 L-DOPA 治疗数年后疗效下降或出现并发症者适用; 而不适用于 PD 伴有心脑血管疾病、痴呆或糖尿病者.

7 细胞移植治疗的实验研究

(1) 多巴胺能神经细胞移植. 1) 同种移植. 瑞典医学家 1990 年已经成功地将胚胎的中脑细胞移植至帕金森病患者脑内, 使其症状得到明显缓解, 提示特异的靶细胞移植对于神经系统疾病的治疗具有一定应用前景. 但存在的问题是移植细胞成活率低、需要量大. 已经有研究发现加入神经营养因子或自由基清除剂可以将移植的 DA 神经元成活率提高 2~3 倍. 这可能有助于减少应用人胎脑细胞的量^[28]. 但同种移植由于来源有限且涉及诸多伦理问题, 难以广泛实施. 2) 异种移植研究发现, 猪脑中具有 DA 能神经元并可发育成为类似于人的相应细胞群. 胎龄 28 d 的猪中脑便可分化出能够合成 DA 的 TH 阳性神经元, 猪的神经母细胞可在 PD 大鼠脑内成功地存活, 并介导其纹状体内广泛的神经支配^[29]. 然而由于异种移植存在免疫排斥反应, 且对于猪脑能否最终替代人脑尚存在争论. 因此这种方法短期内无法用于临床. 3) 神经元前体细胞或神经干细胞的移植. 迄今, DA 能神经元的移植主要是采用分化的神经母细胞和分裂后的神经元, 这些细胞难以大量获得. 如果能够选取在发育前期尚处于主动增殖期的前体细胞, 使其在体外扩增并控制其末端分化成成熟的 DA 能神经元, 这样便可获得大量的细胞用来进行脑内移植. 目前, 已经能够通过用高浓度的生长因子(bFGF 或 EGF)刺激, 在体外扩增这些中脑 DA 能神经元的前体细胞, 并进而将其诱导分化为成熟的 DA 能神经元. 将这种扩增的细胞植入 PD 大鼠纹状体后能够很好地存活和发挥功能^[30]. 而更令人惊奇的发现在即使在 60 岁的老年人脑内也存在神经前体细胞, 并且仍具有分化成神经元的潜能. 无疑采用此类细胞治疗 PD 会具有更广阔的应用前景. 目前对神经前体细胞和神经干细胞的概念尚无严格的界定. 一般认为前体细胞是由干细胞衍生而来, 两者皆具备定向分化和增殖的潜能. 在成年动物的侧脑室壁、海马齿状回已经分离到神经干细胞, 但在黑质中是否也存在着神经干细胞尚不得而知.

(2) 可分泌多巴胺的非神经元细胞移植. 1) 肾上腺嗜铬细胞. 肾上腺嗜铬细胞虽然可分泌 DA, 但其在脑内存活的时间很短, 无法满足临床要求. 研究发现在移植区注入 NGF 或将肾上腺嗜铬细胞与神经胶质细胞或成纤维细胞共同移植能够提高肾上腺嗜铬细胞的存活率和生存时间^[31]. 2) 微囊包裹的 PC12 细胞. 即用一种生物相容性的半透膜包裹能分泌 DA 的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞. 这种微囊化的细胞在激活 DA 受体并在失神经支配的纹状体内发挥功能的同时, 又能有效地避免免疫排斥反应和成瘤性. 1991 年首次将微囊化的 PC12 细胞用于 PD 的研究中, 发现能够明显改善阿朴吗啡诱导的 PD 动物模型的旋转行为^[32]. 3) 颈动脉球细胞. 由于此细胞可分泌少量的 DA, 它也可作为治疗 PD 的替代细胞^[33], 但这方面的研究尚属起步阶段.

无疑, 在以上开发的旨在替代 DA 能神经元的细胞中, 神经干细胞是最具潜力的一种. 如果能从干细胞中得到能无限生长的 GABA 能和谷氨酸能神经元, 就可能将其分化成为用于移植的 DA 能神经元. 如果进一步能将体内的神经干细胞进行原位诱导, 使其定点分化成为 DA 能神经元, 则将会真正实现 PD 细胞治疗的突破. 可以想像一旦干细胞的研究获得成功, 将会取代目前所有的细胞移植疗法成为 PD 治疗的主要手段之一.

8 基因治疗

基因治疗策略主要有两个: 1) 植入促进 DA 合成的酶基因来促进纹状体内 DA 的生成. 由于酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是 DA 合成的限速酶, 因此 TH 基因为 PD 基因治疗的首选. 2) 应用神经保护性营养因子基因阻止 DA 能神经元死亡或刺激受损的黑质纹状体系统的再生和功能恢复, 其中 GDNF 为首选. 其次为 BDNF, NGF 和 NT-3 等. 此外, 将上述两种策略相结合, 以期达到防治兼备的目的则不失为一种更好的策略.

(1) TH 基因修复疗法. 作为 DA 合成的限速酶, TH 基因在 PD 发病机制中起着重要的作用. 提高 TH 的活性可促进左旋多巴的生成, 从而使 DA 的含量及释放量增加. 因而, 最早的基因修复疗法策略即是考虑给患者脑内导入 TH 基因. 常用的有 *in vivo* 和 *ex vivo* 两种方法. 前者是将 TH 裸基因或经病毒载体携带的 TH 基因直接植入 PD 病人脑内的病变部位使其表达 TH; 后者是将携带 TH 基因的重组病毒或质粒转染供体细胞后, 制成基因工程细胞并使其大量繁殖后植入病人脑内. 后者的关键在于构建高效表达的无毒性和成瘤性的 TH 基因工程细胞, 而其中寻找合适的载体(病毒载体或非病毒载体)和供体细胞是最为困难的技术. 研究者在这些方面进行了诸多尝试并取得了初步成效. 将携带 TH 基因的逆转录病毒或质粒表达载体导入温度敏感性的黑质神经细胞系, 并移植到大鼠及灵长目 PD 动物模型脑内两个月后发现动物的症状减轻并且未检测到肿瘤的产生^[34]. Tornatore 等利用人胚中枢神经系统来源的细胞建成一种星形细胞系, 把 TH cDNA 转入其中筛选出的稳定表达克隆. 这种工程细胞不仅表达出了 TH, 而且还保持着星形细胞的营养潜能. 植入大鼠 PD 模型后, 明显改善了其旋转行为^[35]. 首都医科大学徐群渊教授领导的实验室将人 TH 基因重组到逆转录病毒载体后感染人的成纤维细胞, 然后进行微囊包装, 移植入 PD 大鼠脑内, 发现能明显改善大鼠的旋转行为, 提高纹状体内多巴胺的含量^[36]. 上海第二医科大学陈生弟教授用 TH 基因转染肌纤维细胞后, 移植入 PD 大鼠脑内, 也取得了类似的效果^[37].

(2) GTP 环氨酶 1 基因修复疗法. TH 的活性依靠其辅助因子 BH4(四氢喋呤), 在去神经支

配的纹状体内 BH4 的水平较低, 因此将 *TH* 基因和可促进 BH4 合成的 GTP 环氨酶 1 基因共同植入, 能够进一步提高 L-DOPA 的含量^[38].

(3) 芳香族氨基酸脱羧酶基因修复疗法. 芳香族氨基酸脱羧酶(aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC)的作用是催化 L-DOPA 转变为 DA. 在啮齿类动物脑中 AADC 含量和活性很高. 即使在 98%TH 耗竭的大鼠中也只有 80%~85%的 AADC 丢失, 况且剩余的 AADC 可以足够将来自于周围的 L-DOPA 转化成 DA^[39]. 但对人的研究却发现 AADC 在人脑中含量低, 大鼠纹状体内 AADC 的基础活性比人高 10~400 倍^[40]. 因此晚期的 PD 病人 AADC 很缺乏. 研究发现表达 *TH* 基因和 *AADC* 双基因的细胞, 其 DA 产量高于单纯表达 *TH* 基因细胞, 将 *TH* 和 *AADC* 双基因植入 6-OHDA 损伤大鼠脑内后, 其行为的改善明显优于单用 *TH* 基因者^[41]. 将腺病毒介导的 *AADC* 转入 6-OHDA 损伤的大鼠纹状体内, 可以明显增加应用 L-DOPA 后的纹状体内 *AADC* 的活性使 DA 合成增加并且这种脱羧酶的活性可至少存在 6 个月^[42].

(4) 神经保护疗法. 神经保护策略的目的在于运用神经营养因子等类物质保护宿主 DA 能神经元或外源性移植物的存活, 增强其抗损伤能力. 常用的神经营养因子有 GDNF, BDNF 和 NGF 等. 将可分泌 GDNF 的成纤维工程细胞和携带 *GDNF* 基因的腺病毒和腺相关病毒植入 PD 大鼠黑质或纹状体内已经取得了较为明显的效果^[43]. 携带 BDNF 的逆转录病毒也能够改善 PD 大鼠的旋转行为^[44]. Rohrer 等^[45]将 *NGF* 基因连接在锌诱导的金属硫化物启动子后, 转入 PC12 细胞, 将此工程细胞植入大鼠纹状体内, 在锌元素的刺激下, 这些细胞分化为神经元, 并表达 TH, 同时接受 NGF 的自养作用, 克服了单纯移植 PC12 细胞后, 由于神经营养因子的缺乏所导致的在 2 周内发生退变或在宿主体内成瘤的问题. 证明 *NGF* 基因表达工程细胞能够提高 DA 能神经元移植物的存活率, 并可促进其分化.

此外, 有研究者选择一些抗凋亡因子如 *bcl-2*, *bcl-x* 和囊泡单胺转运体-2(vesicular monoamine transporter-2, *VMAT-2*)等作为目的基因来治疗 PD 大鼠, 其效果尚需进一步观察.

(5) 神经修复与保护结合策略. 将神经修复策略同神经保护策略相结合, 达到防治兼备的目的无疑是 PD 基因治疗的最佳策略之一, 是今后 PD 基因治疗的方向. 我所的研究工作主要在此方面. 将不同载体(质粒、腺病毒和腺相关病毒)携带的 *TH* 和 *GDNF* 基因构建的基因工程细胞与原代 DA 能神经元共培养, 证实能够减轻 MPP⁺ 的神经毒性作用并能够促进 DA 能神经元的生长和发育. 目前我们正在进行动物整体实验, 以进一步确定这种方法的疗效.

9 现状与展望

在 PD 发现后的一个多世纪的时间内, 人们与之进行了顽强的斗争, 这一疾病的神秘面纱正在被逐步揭开. 尤其最近几年涉及本病的致病基因的发现是 PD 遗传学研究的重大突破, Feany 等根据遗传学的研究, 将野生型和突变型的 α -Synuclein 基因作为报告基因制备了转基因的果蝇并成功制备了果蝇的 PD 模型, 生长 30~60 d 后该模型脑内 DA 能神经元明显减少, 出现了类似于人类 LB 的 α -Synuclein 包涵体^[46]. 这是首次制备出能够表现人类 LB 的 PD 模型, 将有助于 PD 的遗传学研究, 同时, 也为 α -Synuclein 基因突变在 PD 中的发病作用提供了有力的证据. 但应该看到家族性 PD 的发生可能不仅局限于 1 个基因, 寻找其他的 PD 致病基因仍是 PD 研究的重要方面. 如能确定大的 PD 家系, 采用 DNA 芯片技术进行大规模的基因筛选, 可能会有助于发现新的 PD 致病基因. α -Synuclein 是 PD 病理特征 LB 的主要成分, 那么 LB

内其他的成分在家族性或散发的PD中是否也发生了突变并参与了PD的发生,尚需进一步明确.有关 α -Synuclein的代谢途径、致突变的原因以及它是如何引发PD等问题仍鲜为人知.对于散发性的PD,环境致病的因素不可忽视,因此将分子细胞生物学技术用于环境因素和易感基因的研究中将会有助于明确PD的病因,并为探索有效的治疗方法提供可能.其中DAT在PD发病中的作用将会是一个比较热门的研究领域.另外,对于尚未出现PD的一些特定人群进行长期的跟踪调查,也可能会有助于发现某些环境致病因素.早期诊断技术的普及是防治PD的重要环节,发展更为完善的示踪剂、降低检查的费用将会使更多的PD患者受益.探明在PD病人中损伤的DA能神经元中特异表达的基因;确定控制PD易感神经元分化的方法和研究细胞死亡的途径等,将了解PD的发病机制提供重要线索.神经保护性治疗仍是最为有效的减缓PD进展的措施,存在巨大的潜力,值得认真研究.其中干细胞的移植将无疑会成为最诱人的研究领域^[47].采用合适的技术将非神经细胞(如:骨髓干细胞和成纤维干细胞)诱导分化成神经干细胞;对体内的神经干细胞进行原位诱导,使其定点分化成为DA能神经元;发现能控制干细胞分化的途径;寻找将细胞植入脑内的更有效方法,促进植入的干细胞在成年脑内存活和整合并设法控制其无限制的增殖和潜在的副作用,这些问题的解决将会为干细胞移植在不久的将来走向临床铺平道路.PD基因治疗所面临的问题仍旧严峻,但绝非不可逾越^[48].转基因的长期表达问题尚未解决,细胞毒性和免疫排异问题依然存在.目前所用的启动子尚无法精确控制基因的表达.新一代具有细胞特异性、可调控性的启动子正在开发之中,这可能会有助于增加各种基因治疗途径的效果.

总之,现代科技的发展对PD的研究和认识产生了巨大的影响.对本病病因、诊断和治疗的进展使人们真正看到了预防和控制PD的曙光.基因技术在PD等神经系统疾病的治疗中的应用将无疑是其中最激动人心的一项创造.随着神经干细胞研究的深入,一些相关的问题会相继得到解决,将开创PD治疗的新篇章.

致谢 本工作为国家973项目(批准号:G1999054008)、九五攻关项目(批准号:96-906-05-08)和国家自然科学基金(批准号:39970924)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Wood N. Genes and Parkinsonism. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1997, 62: 305~309
- 2 Polymeropoulos M H, Higgins J J, Globe L I, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. Science, 1996, 276: 2045~2047
- 3 Tohru Kitada, Shuichi Asakawa, Nobutaka Hattori, et al. Mutations in the Parkin gene cause autosomal recessive juvenile Parkinsonism. Nature, 1998, 392: 605~608
- 4 Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek Z K. A susceptibility locus for Parkinson's disease to chromosome 2P13. Nat Genet, 1998, 18: 262~265
- 5 Calne D B, Langston J W. Aetiology of Parkinson's disease. Lancet, 1983, 2: 1457~1459
- 6 Langston J W. Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate. Ann Neurol, 1998, 44(Suppl): S45~62
- 7 Nicholl D J, Bennet P, Hiller L, et al. A study of five candidate gene in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. Neurology, 1999, 53(7): 1415~1421
- 8 Hill W D, Lee V M Y, Hurtig H I, et al. Epitopes located in spatially separate domains of each neurofilament subunit are

- present in Parkinson's disease Lewy bodies. *J Comp Neurol*, 1991, 309: 150~160
- 9 Dexter D T, Sian J, Rose S, et al. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol*, 1994, 35: 38~44
- 10 Heales S J, Bolanos J P, Stewart V C, et al. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1410: 215~228
- 11 Mizuno Y. in *Movement disorders. Neurological Principles and Practices* (Watts R L, Koller W C eds), New York: McGraw-Hill, 1997. 161~182
- 12 Hattori N, Yoshino H, Tanaka M, et al. Allele in the 24-kDa subunit gene (NDUFV2) of mitochondrial complex I and susceptibility to PD. *Genomics*, 1998, 49: 52~58
- 13 Marsden C D, Olanow C W. The causes of Parkinson's disease are being unraveled and rational neuroprotective therapy is close to reality. *Ann Neurol*, 1998, 44(Suppl): S155~159
- 14 Javitch J, Amato R, Strittmatter S, et al. Parkinsonism-inducing neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: up-take of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopaminergic neurons explains selective neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 2173~2177
- 15 Gainetdinov R R, Fumagalli F, Jones S R, et al. Dopamine transporter required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J Neurochem*, 1997, 69: 1322~1325
- 16 Takaloshi N, Miner L, Sora L, et al. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward enhanced amphetamine locomotion, and enhance MP TP toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9938~9943
- 17 Booij J, Tissingh G, Boer G J, et al. [123I]FP-CIT SPECT shows pronounced decline of striatal dopamine transporter labeling in early and advanced Parkinson's disease. *J Neurosurg Psychiatry*, 1997, 62: 133~140
- 18 Tissingh G, Bergmans P, Booij J, et al. [123I]-beta-CIT SPECT in Parkinson's disease reveals a smaller decline in dopamine transporters with age than in controls. *Eur J Nucl Med*, 1997, 24: 1171~1174
- 19 Vermeulen R J, Wolters E C, Tissingh G, et al. Evaluation of [123I]-beta-CIT binding with SPECT in controls, early and late Parkinson's disease. *Nucl Med Biol*, 1995, 22: 985~991
- 20 Kish S J, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease, pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med*, 1988, 319: 876~880
- 21 Morrish P K, Sawle G V, Brooks D J. Clinical and [¹⁸F]DOPA PET findings in early Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1995, 59: 600~697
- 22 Hagg T. Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult rat nigrostriatal neurons in vivo. *Exp Neurol*, 1998, 149: 183~192
- 23 Unsicker K, Suter-Crazzolara C, Kriegstein K. Growth factor function in the development and maintenance of midbrain dopaminergic neurons: concepts, facts and prospects for TGF- β . *Ciba Found Symp*, 1996, 196: 70~80
- 24 Kordower J H, Alfi S, Chen E Y, et al. Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 1999, 46: 419~424
- 25 Steiner J P, Hamilton G S, Ross D T, et al. Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2019~2124
- 26 Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1999, 281: 1309~1312
- 27 Iacono R P, Shima F, Lonser R R, et al. The results, indications and physiology of posteroventral pallidotomy for patients with Parkinson's disease. *Neurosurgery*, 1995, 36: 1118~1127
- 28 Olanow C W, Freman T B, Kordower J H. Neural transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 1997, 74: 249~269

- 29 Molenaar G J, Hogenesch R I, Sprengers M E, et al. Ontogenesis of embryonic porine ventral mesencephalon in the perspective of its potential use as a xenograft in Parkinson's disease. *J Comp Neurol*, 1997, 382: 19~28
- 30 Ling Z D, Potter E D, Lipton J W, et al. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol*, 1998, 149: 411~423
- 31 Date I, Ohmoto T. Neural transplantation for Parkinson's disease. *Cellular and Mol Neurobio*, 1999, 19: 67~78
- 32 Aebischer P, Tresco P A, Sagen J, et al. Transplantation of microencapsulated bovine chromaffin cells reduces lesion induced rotational asymmetry in rats. *Brain Res*, 1991, 560: 43~49
- 33 Espejo E F, Montoro R J, Armengol J A, et al. Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron*, 1998, 20: 197~206
- 34 Ahlskog J E. Cerebral transplantation for Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Mayo Clin Proc*, 1993, 68: 578~591
- 35 Tornatore C, Baker-Cairns B, Yadid G. Expression of tyrosine hydroxylase in an immortalized human fetal astrocyte cell line, in vitro characterization and engraftment into the rodent striatum. *Cell Transplant*, 1996, 5(2): 145~163
- 36 戴晓玲, 赵焕英, 赵春礼, 等. 微囊化转 TH 基因的人成纤维细胞纹状体内移植治疗帕金森病大鼠模型的研究. 见: 中国神经科学学会第二届代表大会暨第三届全国学术会议论文摘要汇编. 北京: 中国神经科学学会, 1999. 289
- 37 Chen S D, Zhao Y C, Liu Z G, et al. Gene therapy in Parkinsonian rats by genetically modified myoblast expressing tyrosine hydroxylase. *Movement Disorders*, 1997, 12(suppl): 81
- 38 Leff S E, Rendahl K G, Spratt S K, et al. In vivo L-DOPA production by genetically modified primary rat fibroblast or 9L gliosarcoma cell grafts via coexpression of GTP cyclohydrolase I with tyrosine hydroxylase. *Exp Neurol*, 1998, 151: 249~264
- 39 Hefti F, Melamed E, Wurtman R J. The site of dopamine formation in rat striatum after L-DOPA administration. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981, 217: 189~197
- 40 Bowsher R R, Henry D P. Aromatic L-amino acid decarboxylase. In: Boulton A A, Baker G B, Yu P H, eds. *Neurotransmitter Enzymes*. NJ: Humana, Clifton, 1986. 33~78
- 41 Imaoka T, Date I, Dhmoto T, et al. Significant behavioral recovery in Parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of a plasmid DNA-liposome complex. *Hum Gene Ther*, 1998, 9: 1093~1102
- 42 Leff S E, Spratt S K, Snyder R O, et al. Long-term restoration of striatal L-aromatic amino acid decarboxylase activity using recombinant adeno-associated viral vector gene transfer in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurosci*, 1999, 92(1): 185~196
- 43 Mandel R J, Spratt S K, Snyder R O. Midbrain injection of recombinant adeno-associated neurotrophic virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 14083~14088
- 44 Yoshimoto Y, Lin Q, Collier T J, et al. Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicits behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*, 1995, 691(1-2): 25~36
- 45 Rohrer D C, Nilaver G, Nipper V, et al. Genetically modified PC12 brain grafts: survivability and inducible nerve growth factor expression. *Cell Transplant*, 1996, 5(1): 57~68
- 46 Feany M B, Bender W W. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, 2000, 404: 394~398
- 47 Barinaga M. Fetal neuron grafts pave the way for stem cell therapies. *Science*, 2000, 287(5457): 1421~1422
- 48 Constantini L C, Bakowska J C, Breakefield X O, et al. Gene therapy in the CNS. *Gene Therapy*, 2000, 7: 93~109

(2000-04-20 收稿, 2000-07-26 收修改稿)