

利鲁唑上调 EAATs 产生对 MPTP 诱导的帕金森模型小鼠的保护作用

米 超¹ 杨欣欣² 齐志鹏² 吴凤迪² 崔东日³ 邓 宇^{2*}

[摘 要] 目的 探讨 MPTP 对 EAATs 的影响及利鲁唑对其诱发帕金森小鼠模型的保护作用。方法 选取 42 只小鼠,随机分为 3 组:对照组(生理盐水组)、MPTP 组(PD 模型组)和 MPTP + 利鲁唑组(利鲁唑治疗组)。采用小鼠转棒实验和疲劳仪实验评价三组小鼠行为学差异;南京建成试剂盒检测纹状体谷氨酸(Glutamate, Glu)含量;Western blot 和 RT-PCR 方法检测小鼠纹状体 EAAT1 及 EAAT2 的表达。结果 与对照组比较,小鼠转棒潜伏期、疲劳耐力时间及跑步距离均明显减少($P < 0.01$),Glu 含量明显增加($P < 0.01$),EAAT1 及 EAAT2 mRNA 表达和蛋白水平显著下降。与 MPTP 组比较,利鲁唑治疗组小鼠转棒潜伏期、疲劳耐力时间及跑步距离均明显增加($P < 0.01$),Glu 含量明显下降($P < 0.01$),EAAT1 及 EAAT2 mRNA 表达和蛋白水平显著升高。结论 利鲁唑可通过上调 EAAT1 和 EAAT2 对 MPTP 诱导的帕金森模型小鼠的运动功能起到保护作用。

[关键词] 利鲁唑; MPTP; 帕金森; 谷氨酸; 兴奋性氨基酸转运体

Effects of riluzole on up-regulation of EAATs to protect MPTP-induced Parkinson's disease in mice model

MI Chao¹, YANG Xin-xin², QI Zhi-peng², WU Feng-di², CHOE Tong-il³, DENG Yu^{2*} (1. Health Service and Administrative Law Enforcement Center of Shenyang, Shenyang 110031, China; 2. Department of Environmental Health, China Medical University, Shenyang 110122, China; 3. Hygienic Faculty, Kim Il Song University Pyongyang Medical College, Pyongyang, DPR Korea)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of MPTP on EAATs and the protection effect of riluzole on MPTP-induced Parkinson's disease in mice model. **Methods** Totally 42 healthy mice were randomly divided into 3 groups: control group (NS group), MPTP group (PD model group) and MPTP + riluzole group (treatment group). Rotarod experiment and fatigue tester system were used to evaluate the behavioral differences among the animals in 3 groups; Nanjing Jiancheng kit was used to test the levels of glutamate (Glu) in striatum; Western blot and RT-PCR were used to detect the levels of EAAT1 and EAAT2 in striatum. **Results** Compared with control group, the rotarod latency, fatigue endurance time, running distance, mRNA and protein of EAAT1 and EAAT2 were decreased in MPTP group significantly, while the levels of Glu increased. Compared with MPTP group, all these indexes except Glu levels in MPTP + riluzole group were increased, while Glu level was decreased. **Conclusion** Riluzole can up-regulate the EAAT1 and EAAT2 to exert protective effects on MPTP-induced Parkinson's disease mice model.

Key words: Riluzole; MPTP; Parkinson's disease; Glutamate; Excitatory amino acid transporters

0 引言

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种进行性、病因不明的神经系统退行性疾病,主要发病人群为 65 岁以上的中老年人,临床表现以静止性震颤、肌肉强直、运动迟缓、姿势步态异常等运动功能症状及睡眠障碍、精神障碍、感觉障碍等自主神经功能障碍等症状为主要特征^[1]。流行病学调查显示,世界范围内 PD 的患病率为 0.3%^[2],其中 65 岁以上年龄段人群占 1%~2%,85 岁以上年龄段人群患病率增加到 3%~5%^[3]。有研究显

示,谷氨酸(Glutamate, Glu)的兴奋性毒性会加速 PD 的病理进展。散发性 PD 患者表现为 Glu 摄取量降低,而且其降低程度与 PD 的严重程度相关^[4]。有研究显示, Glu 的代谢转运障碍与谷氨酸转运体(Excitatory amino acid transporters, EAATs)有密切关系, EAATs 可清除谷氨酸的堆积,进而发挥保护中枢神经系统免受 Glu 兴奋性毒性的作用^[5]。EAAT1 和 EAAT2 主要分布于星形胶质细胞,是 Na⁺/K⁺ 依赖的膜蛋白,可促进 Glu 能突触周围的 Glu 代谢平衡^[6]。

利鲁唑属于苯噻唑类化合物,是目前用于治疗肌萎缩性侧索硬化症的药物,已有文献证实其可抑制 Glu 从神经末梢释放,促进 Glu 与谷氨酸转运体的结合^[7-9]。早在 2002 年就有利鲁唑治疗帕金森的随机对照试验,但是未见关于利鲁唑对 PD 的神经保护作用的报道^[10]。1-甲基-4-苯基-1,2,

收稿日期:2019-01-10

作者单位:1. 沈阳市卫生健康服务与行政执法中心,沈阳 110031; 2. 中国医科大学环境卫生学教研室,沈阳 110122; 3. 金日成综合大学平壤医科大学卫生系,朝鲜 平壤

基金项目:国家自然科学基金项目(81302406)

* 通信作者

DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.201904003

3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)能够造成小鼠黑质纹状体多巴胺能神经元表达减少,并且出现类似人类的运动功能障碍等现象,是制备 PD 模型的常用方法^[11-12]。本研究主要使用 MPTP 建立小鼠 PD 模型后,给予利鲁唑干预,观察小鼠行为学变化情况,以及小鼠纹状体 Glu 含量、EAAT1 及 EAAT2 蛋白表达、mRNA 表达情况,旨在为临床应用利鲁唑治疗帕金森病提供相关理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器 利鲁唑和 MPTP 购自美国 Sigma 公司, Glu 检测试剂盒来自南京建成生物科技有限公司, 鼠抗 EAAT1、EAAT2 及 β -actin 抗体来自 Santa Cruz 公司, HRP 标记山羊抗鼠 IgG、Western blot 相关试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒及电泳液、RIPA buffer 裂解液来自上海碧云天生物技术有限公司。GDS-8000 电泳凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司), 1680 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司), VE-480 垂直电泳槽(上海天能科技有限公司), EPS-300 电泳仪和 VE-486 转印电泳槽(上海天能科技有限公司), 722 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), WD-9405B 型水平摇床(北京市六一仪器厂)。

1.2 实验动物及分组 健康 SPF 级昆明小鼠 36 只, 雌雄各半, 体重(30 ± 2) g。由中国医科大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK2013-0001。本实验经中国医科大学伦理委员会批准, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀, 符合卫生部实验动物管理与使用准则。实验动物可自由摄食饮水, 饲料由中国医科大学实验动物中心提供, 动物房室温 18 ~ 23 °C, 相对湿度为 45% ~ 55%。实验前适应性喂养 1 周后将动物随机分为 3 组, 每组 12 只, 雌雄各半, 分别为: ①对照组, ②MPTP 组(PD 模型组), ③MPTP + 利鲁唑组(利鲁唑治疗组)。注射药品均以 0.9% NaCl 作为溶剂配制, 各组均以腹腔注射的方式给予 5 ml/kg 的药品体积。给予对照组腹腔注射生理盐水, MPTP 组和 MPTP + 利鲁唑组小鼠均腹腔注射 25 mg/kg MPTP。2 h 后, 对照组及 MPTP 组腹腔注射生理盐水, MPTP + 利鲁唑组腹腔注射 0.7 mg/kg 利鲁唑。各组小鼠连续处理 2 周。

1.3 行为学检测 转棒实验用于测试小鼠的运

动协调能力。测试前对每只小鼠进行 3 次适应性转棒训练, 每次训练时长为 3 min。将小鼠置于电动转棒上, 转棒直径为 2.5 cm, 表面为橡胶质地, 转速为 10 r/min, 记录小鼠被置于转棒上至跌落的时间。每只小鼠重复测定 3 次, 每次间隔 30 min, 重复测量 3 次结果, 取其平均值。

疲劳仪实验用于检测小鼠运动耐力。测试前对每只小鼠进行 3 次适应性训练, 时间长约 5 min。将小鼠置于疲劳仪转轮甬道中, 通电后小鼠若不运动则会被底部电极刺激, 记录小鼠被置于疲劳仪内致疲劳致不动时的时间(min)及奔跑距离(m)。每只小鼠重复测量 3 次取平均值。

1.4 小鼠纹状体组织匀浆内 Glu 含量的测定 各组取 6 只小鼠, 分离纹状体, 将部分组织制备成 10% 的组织匀浆, 其余组织备用。使用南京建成试剂盒, 根据 $\text{Glu} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \alpha\text{-oxoglutarate} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+$ 的原理测定 Glu 含量。

1.5 Real-time RT-PCR 检测小鼠黑质纹状体组织 EAAT1、EAAT2 的 mRNA 表达 根据说明书, 使用 Trizol 法提取总 RNA, 样品质量检测结果 260 nm/280 nm 应为 1.8 ~ 2.0。将提取的总 RNA 按照逆转录试剂盒步骤反转录为 cDNA。最后进行荧光定量 PCR, 采用的反应体系为 20 μl , 其中, SYBR 10 μl 、上下游引物各 1 μl 、RNA free H_2O 6 μl 、cDNA 模板 2 μl 。合成小鼠 EAAT1、EAAT2 及 GAPDH 的引物序列如表 1 所示。反应程序设定为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。每次试验均设置 GAPDH 为内参。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组小鼠黑质纹状体组织 EAAT1、EAAT2 的 mRNA 表达的相对表达量。

表 1 引物序列

名称	引物序列
EAAT1	上游 5'-TGCTGCAAGCGCTCATCAC-3'
	下游 5'-GCGTTTGTCACACCATTTGTC-3'
EAAT2	上游 5'-TGACCTTCATCATGGCCTAAACA-3'
	下游 5'-TCAGGCTCACCTGCATGACTACTAA-3'
GAPDH	上游 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
	下游 5'-TTGCTGTTGAAGTCGAGGAG-3'

1.6 Western blot 检测小鼠黑质纹状体组织 EAAT1、EAAT2 的蛋白表达 各组小鼠取 3 只, 分离纹状体, 加入强效 RIPA buffer 裂解液(Ripa buffer: PMSF = 100:1) 在冰上使用组织匀浆破碎机裂

解成组织匀浆,12 000 r/min 4 ℃离心10 min,取上清,使用 BCA 试剂盒测蛋白浓度,并将组织蛋白浓度定量到 4 μg/μl。将 40 μg 蛋白样品与 loading buffer 缓冲液混匀,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后电转至 PVDF 膜,5% BSA 封闭液室温封闭 1 h。4 ℃过夜孵育一抗 EAAT1(1:2 000),EAAT2(1:2 000),β-actin(1:3 000),TBST 洗膜,HRP 标记的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,ECL 发光显影,每只小鼠每项指标重复测量 3 次。使用 Image J 软件分析条带光密度。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。当方差齐时,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验,同时用 SNK-*q* 法检验进行两两比较;当方差不齐时,采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利鲁唑对 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠运动能力障碍的影响 如表 2 所示,与对照组相比,MPTP 处理后,小鼠的转棒潜伏期、耐力潜伏期、跑步距离均缩短($P < 0.05$)。给予利鲁唑干预后,与 MPTP 组比较,转棒潜伏期、耐力潜伏期和跑步距离均延长($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。

2.2 利鲁唑对 MPTP 致小鼠纹状体 Glu 含量增加的影响 与对照组纹状体内 Glu(23.55 ± 5.21) μmol/g pro 相比,MPTP 处理组小鼠纹状体内 Glu 含量升高,可达(45.62 ± 3.25) μmol/g pro($P <$

0.01)。给予利鲁唑治疗后,Glu 含量与 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠相比显著下降,低至(38.36 ± 8.54) μmol/g pro($P < 0.01$)。此部分每组 6 只。

2.3 利鲁唑对 MPTP 致小鼠纹状体 EAAT1、EAAT2 表达下降的影响 应用 RT-PCR 方法,对纹状体内 EAAT1、EAAT2 的 mRNA 表达变化进行观察。如图 1A 所示,与对照组相比,MPTP 组的小鼠纹状体内 EAAT1 的 mRNA 水平降低($P < 0.01$);与 MPTP 组相比,利鲁唑干预后 EAAT1 的 mRNA 水平升高($P < 0.01$)。如图 1B 所示,MPTP 组的小鼠纹状体 EAAT2 的 mRNA 水平较对照组降低($P < 0.01$),而给予利鲁唑治疗后,与 MPTP 组相比,EAAT2 的 mRNA 水平明显回升($P < 0.01$)。

2.4 利鲁唑对 MPTP 致小鼠纹状体 EAAT1 和 EAAT2 表达下降的影响 应用 Western blot 方法,对纹状体内 EAAT1、EAAT2 的蛋白水平变化进行观察。如图 2 所示,将检测到的 EAAT1 及 EAAT2 的蛋白条带进行灰度分析,目的蛋白的灰度水平与相应内参 β-actin 灰度值用比值表示。如图 2A 所示,与对照组相比,MPTP 组小鼠的 EAAT1 蛋白水平显著降低($P < 0.01$)。而与 MPTP 组相比,在利鲁唑治疗组中,EAAT1 蛋白水平显著回升($P < 0.01$)。如图 2B 所示,MPTP 组 EAAT2 蛋白水平显著降低($P < 0.01$),与 MPTP 组相比,给予利鲁唑治疗后,EAAT2 水平显著升高($P < 0.01$)。

表 2 利鲁唑对 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠运动能力的影响

组别	只数	转棒实验	疲劳仪实验	
		转棒潜伏期(min)	耐力时间(min)	奔跑距离(m)
对照组	12	46.74 ± 2.38	36.94 ± 5.81	121.11 ± 20.12
MPTP 组	12	33.08 ± 5.33*	15.59 ± 2.64*	58.23 ± 26.78*
MPTP + 利鲁唑组	12	42.77 ± 6.21 [#]	32.17 ± 7.11 [#]	89.98 ± 30.67 ^{##}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 MPTP 组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

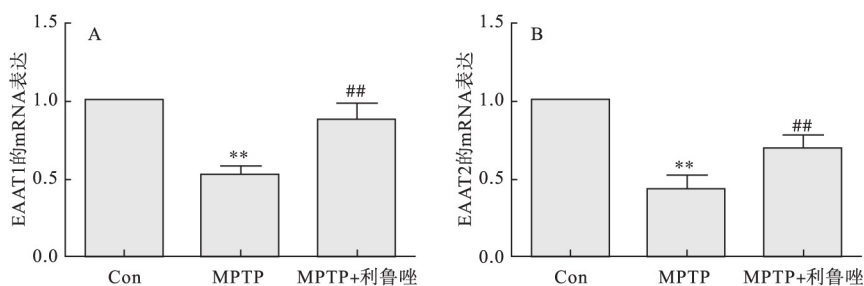


图 1 各组小鼠纹状体内 EAAT1 及 EAAT2 的 mRNA 水平变化(n=3)

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与 MPTP 组比较,## $P < 0.01$

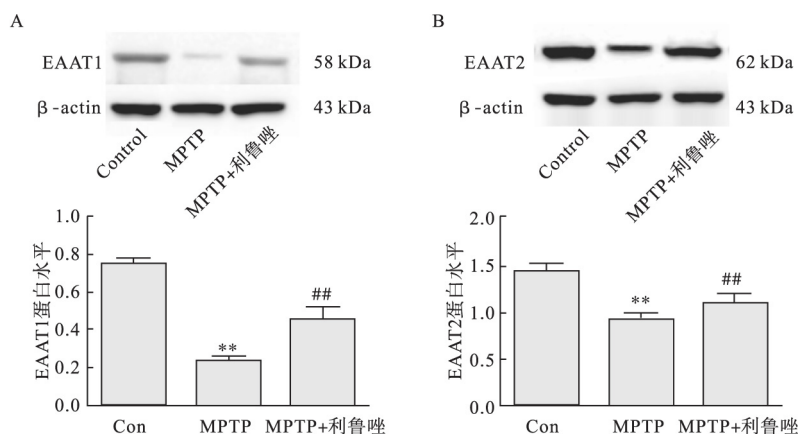


图 2 各组小鼠纹状体内 EAAT1 及 EAAT2 的蛋白水平变化 (n=3)

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 MPTP 组比较 ## $P < 0.01$

3 讨论

随着我国老龄化程度的加剧, PD 的患病率急剧增长,并维持在较高水平^[13]。Glu 的过量堆积是 PD 发病机制中的一个重要环节,与 PD 发病密切相关。其中,EAATs 转运体系统的功能失调是很多 PD 患者共同的特征^[14]。很多针对 Glu 转运体调节的分子都显示出对于神经退行性病变的治疗作用,如头孢曲松、埃他卡林等^[15-16],更重要的是,上调 Glu 转运体也能抑制 α -突触核蛋白、tau 蛋白及 β -淀粉样蛋白的非正常堆积^[17-18]。利鲁唑属于苯噻唑类化合物,有明确的神经保护及抗惊厥等药理作用,然而,应用其干预兴奋性 Glu 转运体进而调节 PD 病理进程的研究很少。Glu 转运体是 Na^+/K^+ 依赖的,而利鲁唑可稳定 Na^+ 通道,抑制 Glu 的释放,增强 Glu 转运体和 Glu 的结合力,能有效减少 Glu 在细胞外的浓度^[8-9]。因此,推测利鲁唑可能会对 MPTP 导致的 PD 模型鼠的 Glu 代谢转运障碍起到一定的保护作用。

EAAT1、EAAT2 是主要表达在星形胶质细胞膜上的 Glu 转运体,主要任务是清除细胞外的 Glu。本实验通过连续给予昆明小鼠注射 25 mg/kg 的 MPTP,共 7 d,建立 PD 模型鼠,并给予 0.7 mg/kg 利鲁唑,以建立利鲁唑干预模型。通过转棒实验及疲劳仪实验检测小鼠的行为学变化,发现 MPTP 处理组的小鼠的耐力时间与奔跑距离均较对照组缩短,说明造模成功,经过 MPTP 处理过的小鼠均达到 PD 患病程度。而经过利鲁唑干预后的小鼠以上运动行为学指标都有不同程度的提升,说明利鲁唑对于 PD 患病小鼠确实具有

显著的改善作用。MPTP 组小鼠 Glu 水平显著高于对照组,说明 PD 小鼠的纹状体区发生了 Glu 的过量堆积或者代谢异常。而利鲁唑可能会对 Glu 重摄取有促进作用。为分析其原因,本研究进一步检测了纹状体 EAAT1、EAAT2 蛋白及 mRNA 表达,结果显示, MPTP 组小鼠黑质纹状体区的 EAAT1、EAAT2 的蛋白及 mRNA 水平均下降,而利鲁唑治疗后,这两种转运体的蛋白及 mRNA 水平较 MPTP 组相比显著回升,说明利鲁唑对于 PD 模型鼠的 Glu 代谢转运障碍具有保护作用。

1996 年即有研究者报道,利鲁唑在帕金森病模型鼠中具有保护性作用,利鲁唑降低了阿扑吗啡诱导的对侧旋转和苯丙胺诱导的同侧旋转,也可以减轻 6-羟基多巴胺引起的黑质-纹状体多巴胺能神经元病变^[19]。在 2000 年,Boireau 等^[20]检测了给予小鼠注射 MPTP 后,利鲁唑对小鼠纹状体内 MPP(+) 形成和积累的影响,发现利鲁唑并没有影响 MPP(+) 的积累,说明利鲁唑对 MPTP 毒性的保护作用并不是因为影响了 MPTP 在体内的代谢。Obinu 等^[21]通过给予帕金森病绒猴利鲁唑治疗后,发现利鲁唑治疗的绒猴保持了更好的运动功能和神经功能。利鲁唑可以保护多巴胺能神经元,并减少帕金森病模型中的行为缺陷。但是,目前关于利鲁唑对帕金森模型保护的具体机制的研究甚少,本研究着眼于机制学,证实了利鲁唑的神经保护功能,也发现了利鲁唑可通过 EAAT1、EAAT2 促进 Glu 的重新摄取,从而发挥 PD 保护作用。

综上所述,本研究重新探索了利鲁唑的其他治疗应用,从帕金森病的发病机制-纹状体区的

Glu 代谢转运异常出发,发现利鲁唑对 PD 小鼠纹状体区 Glu 过量堆积以及转运异常具有抑制作用,并认为通过保护 EAAT1、EAAT2 的数量及功能可以产生神经保护作用,在一定程度上为临床应用利鲁唑治疗帕金森病提供实验理论依据。

参考文献:

- [1] 胡雅,杨文明,杨浩,等. 帕金森病相关致病基因研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(22):3287-3290.
- [2] Goldman SM,Tanne CM,Korell M,et al. Environmental epidemiology of Parkinson's disease[C]. 北京,2007.
- [3] 林剑霞,潘瑶,李妍. 帕金森病的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2015,36(2):144-147.
- [4] Van Laar VS,Roy N,Liu A,et al. Glutamate excitotoxicity in neurons triggers mitochondrial and endoplasmic reticulum accumulation of Parkin, and, in the presence of N-acetyl cysteine, mitophagy[J]. Neurobiol Dis,2015,74:180-193.
- [5] Zhang Y,He X,Meng X,et al. Regulation of glutamate transporter trafficking by Nedd4-2 in a Parkinson's disease model[J]. Cell Death Dis,2017,8(2):e2574.
- [6] Chung EK,Chen LW,Chan YS,et al. Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats[J]. J Comp Neurol,2008,511(4):421-437.
- [7] Mitumoto H. A strategy to develop effective ALS therapy[J]. Brain Nerve,2007,59(4):383-391.
- [8] Irifune M,Kikuchi N,Saida T,et al. Riluzole, a glutamate release inhibitor, induces loss of righting reflex, antinociception, and immobility in response to noxious stimulation in mice[J]. Anesth Analg,2007,104(6):1415-1421.
- [9] Fumagalli E,Funicello M,Rauen T,et al. Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1[J]. Eur J Pharmacol,2008,578(2-3):171-176.
- [10] Jankovic J,Hunter C. A double-blind, placebo-controlled and longitudinal study of riluzole in early Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord,2002,8(4):271-276.
- [11] Aoyama K,Matsumura N,Watabe M,et al. Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction[J]. Eur J Neurosci,2008,27(1):20-30.
- [12] Wu JY,Niu FN,Huang R,et al. Enhancement of glutamate uptake in 1-methyl-4-phenylpyridinium-treated astrocytes by trichostatin A[J]. Neuroreport,2008,19(12):1209-1212.
- [13] Ngm O,Kil M,Munster EM,et al. The effect of a structured medication review on quality of life in Parkinson's disease: the study protocol[J]. Contemp Clin Trials Commun,2019,13:100308.
- [14] Assous M,Had-Aissouni L,Gubellini P,et al. Progressive Parkinsonism by acute dysfunction of excitatory amino acid transporters in the rat substantia nigra[J]. Neurobiol Dis,2014,65:69-81.
- [15] Kong Q,Chang LC,Takahashi K,et al. Small-molecule activator of glutamate transporter EAAT2 translation provides neuroprotection[J]. J Clin Invest,2014,124(3):1255-1267.
- [16] Rothstein JD,Patel S,Regan MR,et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression[J]. Nature,2005,433(7021):73-77.
- [17] Ruzza P,Siligardi G,Hussain R,et al. Ceftriaxone blocks the polymerization of α -synuclein and exerts neuroprotective effects in vitro[J]. ACS Chem Neurosci,2014,5(1):30-38.
- [18] Petr GT,Sun Y,Frederick NM,et al. Conditional deletion of the glutamate transporter GLT-1 reveals that astrocytic GLT-1 protects against fatal epilepsy while neuronal GLT-1 contributes significantly to glutamate uptake into synaptosomes[J]. J Neurosci,2015,35(13):5187-5201.
- [19] Barnéoud P,Mazadier M,Miquet JM,et al. Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat[J]. Neuroscience,1996,74(4):971-983.
- [20] Boireau A,Dubedat P,Bordier F,et al. The protective effect of riluzole in the MPTP model of Parkinson's disease in mice is not due to a decrease in MPP(+) accumulation[J]. Neuropharmacology,2000,39(6):1016-1020.
- [21] Obinu MC,Reibaud M,Blanchard V,et al. Neuroprotective effect of riluzole in a primate model of Parkinson's disease: behavioral and histological evidence[J]. Mov Disord,2002,17(1):13-19.