

- 临床意义[J]. 北京医科大学学报, 1993, 25(6): 40
- 2 Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances[J]. Diabetologia, 1985, 28(8): 574 - 578
- 3 丁长江, 王宝珍. 玉米须中氨基酸的含量测定[J]. 人参研究, 2000, 12(3): 35 - 36
- 4 张育光. 玉米须化学成分、药理作用及其应用研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2007, 5(2): 34 - 35

- 5 Catala J, Daumas M, Chanh AP, *et al.* Insulin and glucagons impairments in relation with islet cells morpho - logical modifications following long term pancreatic duct ligation in the rabbit - a model of non - insulin - dependent diabetes[J]. Int J Exp Diabetes Res, 2001, 2(2): 101 - 112

(收稿: 2009 - 11 - 19)

(修回: 2009 - 12 - 18)

一种 Alzheimer 痴呆小鼠模型的建立

王清华 徐如祥

摘要 目的 建立 Alzheimer 痴呆 (Alzheimer dementia, AD) 小鼠模型。**方法** C57BL/6 小鼠基底巨细胞核 (NBM) 注射 Ibotenic 酸制成 AD 模型。8 周后应用 8 方向迷宫评价小鼠痴呆程度, 应用免疫组织化学染色观察 NBM 和脑皮质胆碱能系统和 β - 淀粉样蛋白表达改变。**结果** NBM 内胆碱能神经元明显减少, 5 - 羟色胺 (5 - HT) 神经元和 GABA 神经元轻度减少。同侧额、顶叶皮质内胆碱能神经纤维显著减少, 5 - HT 神经轴突轻度减少, 伴大量 β - 淀粉样蛋白表达, GABA 神经元则无明显变化。NBM 毁损小鼠的工作记忆错误显著升高, 小鼠的近事记忆明显损害。**结论** NBM 注射 Ibotenic 酸能建立一种可靠的 AD 小鼠模型。

关键词 基底巨细胞核 胆碱能神经元 Alzheimer 痴呆模型 小鼠

Establishment of a Mouse Model of Alzheimer Dementia. Wang Qinghua, Xu Ruxiang. Department of Neurosurgery, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangdong 510282, China

Abstract Objective To establish a Alzheimer dementia (AD) model in mice. **Methods** The C57BL/6 mice were lesioned with ibotenic acid in Nucleus basalis of Meynert (NBM). Behavioral tests by eight - arm radial maze were conducted 8 weeks, and immunohistochemical staining of choline acetyltransferase (ChAT), serotonin (5 - HT), GAD (GABA), amyloid - β protein (AP) was conducted 12 weeks after NBM lesioning. **Results** In NBM lesioned mice, the ChAT - positive neurons, serotonin - positive neurons, and GAD - positive neurons in right NBM reduced, and ChAT - positive neurons reduced most evidently. At the same time, the ChAT - positive fibers in prefrontal and parietal cortices decreased significantly, serotonin - positive axons slightly, accompanied by heavily AP co - expression. On the contrary, there was no change of GAD - positive neurons in cortex. The working memory error increased significantly. **Conclusion** Ibotenic acid lesioning in NBM can provide as a model of AD in that it produces deafferentation of cholinergic system and recent memory disruption.

Key words Nucleus basalis of meynert; Cholinergic neuron; Alzheimer dementia model; Mouse

Alzheimer 痴呆 (AD) 是一种常见的神经系统退行性疾病, 其在老年人群中的发病率呈逐年上升的趋势^[1]。AD 的首发症状是进行性近事记忆下降。胆碱能学说在 AD 发病机制中占有重要地位。尸体解剖发现 AD 患者基底巨细胞核 (NBM) 内胆碱能神经元缺失和额、颞、顶叶广泛皮质的失胆碱能支配, 全脑退行性变及广泛性脑萎缩。在 AD 的额、颞、顶叶皮质内最明显的病理改变是细胞外 β - 淀粉样蛋白 (AP) 沉积所致的痴呆斑 (SP)^[2,3]。目前认为 SP 主

要累及皮质胆碱能神经系统, 从而引起以记忆障碍为主的痴呆症状。本研究以破坏 NBM - 脑皮质胆碱能系统为设想, 以脑皮质去胆碱能支配和小鼠近事记忆损害为观察指标, 探索建立一种 AD 模型以供实验研究。

材料与方法

1. 动物与分组: 9 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 20 ~ 22g, 随机分为 3 组。①损伤组 ($n = 14$), 采用 ibotenic 酸毁损右侧 NBM; ②假手术组 ($n = 12$), 右侧 NBM 注射 PBS; ③正常对照组 ($n = 15$), 同龄小鼠不做任何处理。

2. NBM 毁损: 应用 ketamine (60mg/kg 体重) 和 xylazine (20mg/kg 体重) 复合液腹腔注射麻醉后, 小鼠固定于立体定

向仪(SR-6N, Narishige, Japan), 于右侧头顶做一小切口, 颅骨开一小窗。将一微玻璃注射针(内径 50 μ m)连接至 2 μ l 的 Hamilton 微量注射器, 显微注射 0.5 μ g ibotenic 酸/0.1 μ l 0.1mmol/L PBS 至右侧 NBM 的两个毁损点。坐标如下: A = -0.1, L = 2.0, DV = 4.2; A = -0.8, L = 2.5, DV = 4.0^[4]。注射时间 3min, 留针 3min, 退针 3min。假手术组右侧 NBM 注射 0.1 μ l 0.1mmol/L PBS。

3. 行为学评价: 行为学评价测试小鼠的学习记忆能力, 参考文献方法采用 8 方向迷宫法^[5]。测试开始于 NBM 毁损后 8 周。8 方向迷宫由 8 个同轴分布、密闭的长 25cm、宽和高各 6cm 的有机玻璃结构组成。中心为直径 10.5cm, 高 6cm 的圆形站台, 其顶为活动的有机玻璃盖。8 方向迷宫的底为木质结构, 漆成乳白色, 置于封闭的房间内, 高于地面 50cm, 房间内的景物和照明恒定, 测试者位于迷宫的恒定位置旁。每次测试的完成按以下标准: 将禁食、水使体重降至 80%~85% 的小鼠置于中心站台内, 让其自由进入每个迷宫, 觅食完毕置于迷宫末端的重 15mg 的饲料。实验前 3 天对小鼠进行适应性训练, 每个迷宫末端均放置 15mg 的饲料, 让小鼠分别进入每个迷宫并进食完毕饲料, 每天 1 次, 为时 3 天。正式测试时仅在 4 个固定的迷宫末端放置 15mg 的饲料作为奖赏, 其余 4 个迷宫无饲料。以两个指标评价小鼠的学习记忆能力: 重复进入放置有饲料的迷宫记为工作记忆错误(working memory error, WME)1 次, 重复进入未放置饲料的迷宫为参考记忆错误(reference memory error, RME)1 次。测试每天 1 次, 共 18 次。

4. 组织学和免疫组织化学观察: 行为学测试完毕后 1 周, 所有小鼠经 Ketamine 和 Xylamine 深度麻醉后, 经左心室灌注生理盐水 3min, 继之灌注 4% 冰冷多聚甲醛/0.1mol/L PBS (pH 值 7.4) 30min, 断头, 取脑置于 4% 多聚甲醛内 4℃ 过夜。应用振动切片机切成 30 μ m 厚的冠状和矢状切片, 部分用于 HE 染色, 其余连续切片采用漂浮法行免疫组化染色。单标免疫组化使用抗乙酰胆碱转移酶(ChAT), 抗(5-HT), 抗谷氨酸脱羧酶(GAD)(GABA), β -AP; 双标免疫组化染色采用 ChAT-AP, serotonin-AP。抗体稀释度如下: ①兔抗 ChAT (Sigma): 1:1000; ②兔抗 5-HT (Sigma): 1:5000; ③兔抗 GAD (Chemico): 1:1000; ④鼠抗 AP (molecular probes) 1:50。4℃ 反应 48h。相邻切片不加上述第 1 抗体为阴性对照。第 2 抗体稀释度为: ①羊抗兔 IgG Alexa 11034 (molecular probes) 1:1000; ②抗鼠 IgG Alexa 11031 (molecular probes) 1:1000, 4℃ 反应过夜。切片贴于玻片, 水溶性封片液 (immunotech, marseille, france) 封片, 激光共聚焦显微镜 (olympus, Japan) 观察荧光染色。

5. 统计学处理: 行为学测试结果 (WME 和 RME) 采用单因素方差分析和 *t* 检验处理, $P < 0.05$ 为差异显著, 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1. NBM Ibotenic 酸毁损后皮质去胆碱能支配: 正

常对照组小鼠 NBM 内有丰富的 ChAT(胆碱能)、抗(5-HT)和抗 GAD(GABA)阳性神经元(第 128 页彩图 9 中 a、e、i), 前额叶和顶叶皮质内有丰富的 ChAT 阳性神经纤维, 5-HT 阳性神经轴突和 GAD 阳性神经元(第 128 页彩图 9 中 c、g、k), 皮质内仅有少量 β -AP 表达。NBM 毁损小鼠毁损侧 NBM 内 ChAT 阳性神经元明显减少, 5-HT 和 GAD 阳性神经元轻度减少(第 128 页彩图 9 中 b、f、j), 同时前额叶和顶叶皮质 ChAT 阳性神经纤维大部分消失, 5-HT 阳性神经轴突轻度减少(第 128 页彩图 9 中 d、h), 伴大量 β -淀粉样蛋白表达(封三彩图 10 中 a、b)。相反的, 上述皮质区域 GAD 阳性神经元无明显变化(第 128 页彩图 9 中 l)。

2. 行为学评价: 图 1 显示 3 组小鼠 18 次测试的 WME 的平均值。NBM 损伤组小鼠的 WME 较正常对照组明显升高($t = 6.13, P < 0.001$)。各组小鼠的 RME 无明显差异($P > 0.05, F = 0.1439, df = 4.62$)。

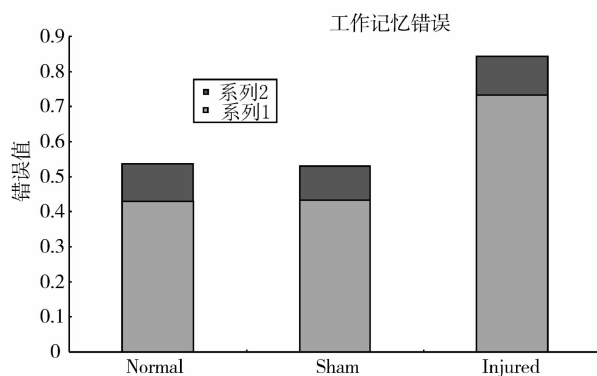


图 1 NBM 核毁损后 8 方向迷宫评价结果

NBM 损伤组小鼠的工作记忆错误值较正常对照组明显升高($t = 6.13, P < 0.001$)

讨 论

AD 以进行性记忆能力下降和脑皮质高级活动障碍为特征, 最终导致大脑思维和精神活动丧失。近年来对其发病机制的认识不断深入, 但尚未完全阐明其本质。胆碱能学说是 AD 发病机制的重要内容之一, 包括以下两个方面^[1,6]: ①神经病理检查发现, AD 的疾病过程中, 基底前脑(主要是 NBM)胆碱能神经元严重减少, 神经化学检测发现该部位乙酰胆碱合成的关键酶——ChAT 活性降低乃至丧失; ②大脑皮质以胆碱能神经纤维减少为特征的失胆碱能支配导致记忆丧失。神经解剖学研究已表明, 由 NBM 的胆碱能神经元向额、颞、顶等脑皮质区域投射的胆碱能神经纤维系统组成脑内胆碱能神经的主要传导通

路^[7]。AD 的胆碱能学说认为, NBM 内胆碱能神经元凋亡导致投射纤维减少, 大脑皮质失胆碱能支配, 乙酰胆碱合成下降, 皮质内 SP 大量形成, 引起记忆障碍。目前认为, 除胆碱能神经递质外, 5-HT 和 GABA 能神经递质系统亦可能参与 AD 的病理过程^[2,7]。在本文的模型中, NBM 内胆碱能神经元减少最明显, 5-HT 神经元和 GABA 神经元轻度减少, 其原因可能是胆碱能神经元对毒性损伤的敏感性较强。由此而引起同侧额、顶叶皮质内胆碱能神经纤维显著减少, 5-HT 神经轴突轻度减少, GABA 神经元则无明显变化。结果证实胆碱能损害机制在 AD 发病机制中的重要地位。

AD 记忆障碍的特征是近事记忆丧失。大量研究证实, 大脑皮质失胆碱能支配是引起近事记忆丧失的重要原因。本研究采用 8 方向迷宫评价小鼠 NBM 毁损后学习记忆能力的改善情况。小鼠完成该实验依赖两个记忆要素。一是快速认识并记住有食物奖赏的迷宫且不重复进入, 为工作记忆 (working memory, WM), 二是记住无食物奖赏的迷宫且不重复进入, 为参考记忆 (reference memory, RM)。前者的记忆痕迹在短时间内消失, 而后者是一种视觉空间记忆, 一般能维持较长时间直至下一次测试。因而 WM 代表瞬时记忆或近事记忆, RM 代表长时记忆^[8,9]。小鼠重复进入有食物奖赏的迷宫视为 WME, 重复进入无食物奖赏的迷宫为 RME。实验结果显示, NBM 毁损小鼠的 WME 显著升高。各组动物的 RME 无明显差异。

本研究结果表明, NBM 毁损小鼠 NBM 内胆碱能神经元和额、顶叶皮质内胆碱能神经纤维显著减少,

皮质内大量 β -淀粉样蛋白表达, 小鼠近事记忆明显受损。NBM 注射 Ibotenic 酸可制成一种可靠的 AD 模型。

参考文献

- Herholz K, Weisenbach S, Kalbe E. Deficits of the cholinergic system in early AD. *Neuropsychologia*, 2008, 46(6): 1642-1647
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiology*, 2002, 68: 209-245
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 1121-1159
- Fricker-Gates RA, Shin JJ, Tai CC, *et al.* Late-stage immature neocortical neurons reconstruct interhemispheric and from synaptic contacts with increased efficiency in adult mouse cortex targeted. *The J Neuroscience*, 2002, 22: 4045-4056
- Belleville S, Peretz I, Malenfant D. Examination of the working memory components in normal aging and in dementia of the Alzheimer type. *Neuropsychologia*, 1996, 34: 195-207
- Schliebs R, Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 2006, 113(11): 1625-1644
- Geula C, Nagykeri N, Nicholas A, *et al.* Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67(4): 309-318
- Goldman-Rakic PS. Cellular basis of working memory. *Neuron*, 1995, 14: 477-485
- Hodges H. Maze procedure: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res*, 1996, 3: 167-181

(收稿: 2009-12-08)

(修回: 2009-12-16)

D-二聚体水平测定在系统性红斑狼疮及继发抗磷脂综合征中的意义

刘 爽 王 玉 徐胜前 连 莉 徐建华

摘 要 **目的** 探讨系统性红斑狼疮 (SLE) 患者外周血中 D-二聚体水平的变化及其在 SLE 继发抗磷脂综合征 (APS) 中的意义。**方法** 采用免疫比浊法测定 104 例 SLE 患者和 50 例正常人外周血中 D-二聚体水平, 并比较 D-二聚体水平在 SLE 继发及无继发 APS 组间的差别。**结果** SLE 组外周血中 D-二聚体水平明显高于正常人组, 差别有显著统计学意义 ($t=5.172, P<0.0001$)。与 D-二聚体水平正常组 SLE 患者相比, D-二聚体水平升高组 SLE 患者的 SLEDAI 积分、IgG 水平、GLO 水平、胸膜

作者单位: 230022 合肥, 安徽医科大学第一附属医院风湿免疫科

通讯作者: 徐胜前, 电子信箱: xsqian-1112@163.com