

老年性痴呆模型大鼠学习记忆功能障碍的实验探讨

李 林¹, 夏保芦¹, 茹立强²

(1. 江汉大学 医学院组织学与胚胎学教研室, 武汉 430056; 2. 华中科技大学 同济医学院神经生物学系, 武汉 430030)

摘要: 目的: 探索 D-半乳糖- $A\beta$ 复合模型大鼠学习记忆功能的改变, 研究老年性痴呆 (AD) 的发病机制. 方法: (1) 采用 1.25% D-半乳糖腹腔注射 (50 mg/kg·d, 连续 6 周) 致衰老, 结合双侧海马齿状回背侧注射 $10 \mu\text{g} / 1 \mu\text{L}$ 凝聚态 β -淀粉样肽₁₋₄₀ (β -amyloid peptide, $A\beta_{1-40}$) 的复合造模方法, 拟建立 AD 样学习记忆功能障碍的动物模型. 实验动物随机分成 3 组: AD 模型组、假造模对照组和正常对照组. (2) 以单位时间逃避潜伏期 (s/3 min) 及其逃生错误频率 (次/3 min) 为观察指标, 进行水迷宫行为学试验测定大鼠学习记忆功能的改变. 结果: AD 大鼠安全逃避潜伏期明显延长, 逃生错误频率高, 与两对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$). 结论: D-半乳糖- $A\beta$ 复合造模致 AD 大鼠模型具有较好的老年性痴呆的仿真特性. 水迷宫行为学试验能准确反映动物学习记忆功能.

关键词: 老年性痴呆; β -淀粉样肽蛋白; 动物模型; 水迷宫试验; 学习记忆

中图分类号: R749.16 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-0143(2009)01-0077-03

老年性痴呆 (aging dementia, AD)^[1, 2] 是一种以进行性智能减退为特征的中枢神经系统退行性疾病, 其主要临床表现为进行性远近期记忆障碍、分析判断能力衰退、认知功能障碍、人格改变和行为失常, 可发展到意识模糊. AD 是世界范围内严重影响老年人健康的多发病, 成为继心脏病、肿瘤及脑卒中之后的第 4 位致死病因. AD 的病因、发病机制尚未完全清楚, 其基本病理特征为神经元纤维缠结、老年斑及神经细胞丢失 (含细胞凋亡). 现代医学研究认为 $A\beta$ 启动了 AD 的发病, 并在其发生、发展中起关键作用, 同时 $A\beta$ 的神经毒性被认为是脑细胞凋亡过程的诱导因素. 因此, 本研究采用 D-半乳糖 (腹腔注射) 致衰老, 结合 $A\beta_{1-40}$ (海马注射)^[3, 4] 诱发学习、记忆功能障碍的动物模型, 为研究人类 AD 的发病机制及其防治提供实验资料.

1 材料和方法

1.1 实验动物

Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 40 只, 清洁二级, 体重 (220 ± 20) g (华中科技大学同济医学院实验动物学部提供). 动物于专用实验室内分

笼饲养, 室温 (22 ± 2) °C, 自由摄食和饮水.

大鼠随机分为 3 组: AD 模型组 20 只, 假造模对照组 10 只和正常对照组 10 只.

1.2 主要试剂及仪器

D-半乳糖 (Sigma 公司, 美国), $A\beta_{1-40}$ (Sigma 公司, 美国), 水合氯醛 (国产分析纯). Y-型水迷宫 (中国医学科学院药物所), 江湾 I 型立体脑定位仪 (上海川沙花木农机厂).

1.3 复合造模方法

采用 D-半乳糖和 $A\beta_{1-40}$ 诱发大鼠学习记忆功能障碍模型.

(1) D-半乳糖腹腔注射.

参照文献 [5, 6] 以无菌生理盐水配制 1.25% D-半乳糖溶液. AD 模型组按 50 mg/kg·d 的 D-半乳糖盐液腹腔注射, 连续 6 周.

假造模对照组大鼠腹腔注射与模型组等量的生理盐水, 连续 6 周. 正常对照组大鼠不做任何处理.

(2) $A\beta_{1-40}$ 海马注射.

$10 \mu\text{g} A\beta_{1-40}$ 溶于 $1 \mu\text{L}$ 无菌生理盐水, 用前 37°C 下孵育 1 周^[3], 使其凝聚老化.

参照大鼠脑立体定位图谱进行 $A\beta_{1-40}$ 双侧海

收稿日期: 2008-11-12

基金项目: 湖北省卫生厅科研计划项目 (2005-JX2C35)

作者简介: 李 林 (1957-), 女, 湖南祁阳人, 副教授, 主要从事基础神经病学研究.

马注射,定位坐标为前囟后 3.5 mm,脑正中线旁开 2.0 mm,深度 2.7 mm^[3]. 在 D-半乳糖连续处理 6 周后的第 2 日起,施行 A β ₁₋₄₀ 海马注射. 即:大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.35 g/kg) 麻醉,头顶部消毒并切开 1.5 cm 长切口,暴露颅骨和前囟,钻开颅骨,在双侧海马齿状回背侧缓慢注入 A β ₁₋₄₀ 各 1 μ L. 注射完毕后留针 5 min,然后缓慢起针,蜡封针孔,止血消炎,缝合皮肤. 大鼠放回鼠笼中常规饲养. 术后肌注青霉素抗感染 (40 万 U/d·只),连续 7 d.

假造模对照组大鼠与模型组同法,于海马区注射生理盐水 1 μ L. 正常对照组大鼠不做任何处理.

1.4 动物学习记忆功能测试与实验动物筛选

1.4.1 Y-型水迷宫试验 对每组实验大鼠分别进行水迷宫学习记忆行为学测试,选择学习记忆行为“正常”的大鼠入围实验^[7]. 每组动物造模完成后第 7 日,采用水迷宫试验鉴定动物模型.

(1) Y-型水迷宫装置: 一个 Y-型有机玻璃管,在其上方中央开有 3 条通道入口(呈三角形柱),其中 2 条管道顶端封闭(盲端),一条管道作为安全(逃生)通道,即顶端设置一个阶梯,动物可循此上岸逃避溺水. Y-型水迷宫放入 140 cm \times 160 cm 椭圆形水池,水深 40 cm,水温 (24 \pm 1) $^{\circ}$ C.

(2) 预训练 4 d,每天 2 次,每次训练时间定为 3 min,3 min 仍未找到安全通道者以 180 s 计算. 训练第 1 天让大鼠自由游泳,第 2~4 天训练时,试验者可引导大鼠进入安全通道.

(3) 记录大鼠从入水起点至寻找到阶梯出水的时间(平均逃避潜伏期, s/3 min)和进入盲端的错误次数(逃生错误频率, 次/3 min).

1.4.2 动物筛选 按照 Zealona 5 级评分法^[8],在造模大鼠清醒后,立即进行动物神经功能的评定. 评定标准为: 正常 (0 分); 对侧肢体屈曲 (1 分); 拖鼠尾后拉时,对侧肢体无力 (2 分); 拖鼠尾后拉时,向对侧转圈 (3 分); 自发向对侧转圈或倾倒 (4 分). 选取评分为 2 级以上者入围实验.

1.5 统计学方法

所有的数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS10.0 统计学软件进行方差分析和多组间均数比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

本实验的全部大鼠于实验前学习记忆功能无明显异常. 模型组大鼠均出现明显的神经功能障碍,为 2~3 分级,无瘫痪或死亡动物.

2.1 逃避潜伏期比较

造模前,各组大鼠水迷宫的潜伏期差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 造模后,AD 模型组的大鼠潜伏期较正常对照组和假造模对照组明显延长,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而两对照组的潜伏期比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),结果见表 1.

表 1 水迷宫试验逃避潜伏期比较 s/3 min

组别	<i>n</i>	造模前	造模后
正常对照组	10	9.25 \pm 1.39	9.50 \pm 1.47
假造模对照组	10	9.18 \pm 1.88	9.38 \pm 1.52
AD 模型组	20	9.30 \pm 0.69	22.87 \pm 1.40*

与两对照组比较 * $P < 0.01$

2.2 逃生错误频率比较

造模前,各组大鼠误入盲端(逃生错误频率)的次数均少,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),两对照组大鼠误入盲端的次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$). 造模后,AD 模型组逃生错误频率较两对照组明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),结果见表 2.

表 2 水迷宫试验逃生错误频率比较 次/3 min

组别	<i>n</i>	造模前	造模后
正常对照组	10	1.75 \pm 0.59	1.90 \pm 0.65
假造模对照组	10	1.69 \pm 0.63	1.94 \pm 0.80
AD 模型组	20	1.77 \pm 0.65	6.50 \pm 1.47*

与两对照组比较 * $P < 0.01$

3 讨论

有关 AD 动物模型的研究有不同的假说,目前已开展了多种动物模型研制与应用. 已建立的标准 AD 动物模型主要有以下几种: (1) 胆碱能系统损伤致痴呆动物模型,这种模型多被用于研究胆碱能系统在认知方面的作用和胆碱能药物研究等^[9]. (2) 转基因 AD 动物模型,主要用于 AD 病理改变与 β -淀粉样肽前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 或含 A β 片段基因相关性研究^[10]. (3) 衰老动物模型,包括快速老化小鼠,自然衰

老动物及D-半乳糖诱导的拟衰老动物模型^[5, 6, 11]。D-半乳糖诱导的拟衰老动物模型, 实施D-半乳糖腹腔注射6周, 造成亚急性中毒状态, 在体内产生大量超氧阴离子自由基, 对组织产生氧化损伤, 实验动物出现类似衰老学习记忆障碍特征, 又类似AD脑内生化学表现, 是目前较为常用的致衰老模型。(4)与A β 有关的AD动物模型, A β 是AD患者脑内老年斑的主要成分, 由APP水解而产生, 在机体内代谢障碍而沉积在海马、基底核等部位。能仿真产生神经纤维缠结, 诱导神经元退行性变的病理学改变和学习记忆障碍的行为学改变。因而认为应用A β 处理可以建立作为AD研究的动物模型^[3, 4, 12-14]。

理想的AD动物模型, 一是要能仿真出AD的行为学改变; 二是要能模拟复制出AD的主要病理和神经化学信息物质等多方面的改变。因此, 本研究动物模型采用复合AD动物模型, 即在腹腔注射D-半乳糖致衰老的基础上于大鼠海马内注射A β_{1-40} 诱发AD模型进行实验研究。本研究施用的水迷宫是检测大鼠空间学习记忆能力的常用装置^[7, 15], 为评价实验大鼠认知水平能力(障碍或改善程度)的一种行为学模式, 以大鼠逃避潜伏期反映大鼠寻找安全或逃生通道的空间认知能力, 以大鼠逃生错误频率来反映大鼠的空间记忆(近记忆)能力。实验结果证明造模后AD样大鼠平均逃避潜伏期较对照组显著延长, 出现错误次数显著增多, 提示AD模型组大鼠在水迷宫试验中学习定位能力显著下降, 存在明显的学习记忆功能障碍, 从而证明造模成功, 并表明较A β 单一造模优越^[12]。

参考文献:

[1] 茹立强, 王才源, 殷光甫. 神经科学基础[M]. 北京: 清

华大学出版社, 2004; 339, 351.

- [2] 王德生, 张守信. 老年性痴呆[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001; 114-116.
- [3] MIGUEL-HIDALGO J J, CACABELOS R. β -amyloid1-40-induced neurodegeneration in the rat hippocampal neurons of the CA1 subfield[J]. Acta Neuropathol, 1998, 95(5): 455-465.
- [4] PEPEU G L, GIOVANNELLI L, CASAMENTI F, et al. Amyloid β peptides injection into the cholinergic nuclei: morphological, neurochemical and behavioral effects[J]. Prog Brain Res, 1996, 109: 273-282.
- [5] SANG X, BAO M, LI D. Advance glycation in D-galactose induced mouse aging model [J]. Mech Ageing Dev, 1999, 108(3): 239-251.
- [6] 张葳, 张昱, 赵晴, 等. β -淀粉样蛋白对D-半乳糖致衰老大鼠学习记忆及海马超微结构的影响[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2005, 31(2): 246-248.
- [7] 叶翠飞, 张丽, 艾厚喜, 等. 两种水迷宫实验对拟痴呆模型学习记忆功能测试的比较[J]. 中国行为医学科学杂志, 2004, 13(3): 256-261.
- [8] ZEALONGA E Z, WEINSTEIN P P, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] YAMADA K, NABESHIMA T. A animal model of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs [J]. Pharmacology Therapeutics, 2000, 88(6): 93-113.
- [10] JANUS C, WESTAWAY D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease[J]. Physiol Behav, 2001, 73(5): 873-886.
- [11] 楚晋, 李林. D-半乳糖致脑老化动物模型及其机理[J]. 中国康复理化与实践杂志, 2003, 9(9): 521.
- [12] 李龙宜, 茹立强. 丹参酮对海马内注射 β -淀粉样蛋白后大鼠学习记忆障碍的影响[J]. 中国老年学杂志, 2003, 23(5): 294-297.
- [13] 吕成, 胡小玲, 方伟, 等. β -淀粉样蛋白仿真老年性痴呆动物模型的建立[J]. 江西医学院学报, 2005, 45(1): 28-39.
- [14] 佺剑非, 陈红, 任常山, 等. β -淀粉样蛋白脑室内注射建立阿尔茨海默病大鼠模型[J]. 中国神经精神病杂志, 2005, 31(2): 145-147.
- [15] MORRIS R. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. Neurosci Methods, 1984, 11(1): 47-60.

Learning and Memory Impairment of Model Rat of Aging-dementia

LI Lin¹, XIA Bao-lu¹, RU Li-qiang²

(1. Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Jianghang University, Wuhan 430056, China;

2. Department of Neurobiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective: To explore on learning and memory impairment of model rats induced by D-galactose and A β_{1-40} , for mechanism of aging-dementia (AD). **Methods:** (1) With 1.25% D-galactose (50mg/kg·d, 6 weeks) injected into abdominal cavity and incubated β -amyloid peptide

(下转第84页)

higher than those in non-cancerous gastric mucosa ($P < 0.05$). The values of COX-2 and VEGF-C in the groups of lymph-node metastasis and non-lymph-node metastasis were significantly different, there is obvious correlation between the expression of mRNA of COX-2 and VEGF-C ($P < 0.05$). **Conclusion:** There are high COX-2 and VEGF-C, D, R3 mRNA expression in gastric cancer. Gastric tumor tissues that produce VEGF-C may have a higher lymphatic invasion and metastatic potential. COX-2 may participate in VEGF-C, D and/or VEGF-R3 lymphangiogenic pathway in gastric cancer.

Key words: gastric cancer; cyclooxygenase-2; vascular endothelial growth factor

(责任编辑: 范建凤)

(上接第79页)

protein 1-40 ($A\beta_{1-40}$) injected bilaterally into the dorsal lateral of the dentate gyrus in the hippocampus of rats, AD-like animal model on learning and memory impairment was established. The experimental animals were divided randomly into three groups: AD model group, false model group and normal control group. (2) Using a water-maze test, escape latency and frequency of escape failure were used as the index to assess learning and memory function of rats. **Results:** Escape latency of AD model rats was obviously prolonged (22.87: 9.38 s / 3 min), and frequency of escape failure was increased significantly (6.50: 1.94 times / 3 min) as compared with two control groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Learning and memory impairment of AD-like rat models induced by D-galactose and $A\beta_{1-40}$ have preferably characters of aging-dementia. The water-maze test can assess accurately the learning and memory function of rats.

Key words: aging-dementia (AD); β -amyloid peptide protein ($A\beta$); animal model; water-maze test; learning and memory

(责任编辑: 陈 旷)