论著

文章编号:1000-5404(2008)13-1264-04

脑缺血对阿尔茨海默病大鼠认知功能的影响

李 静,周华东,王延江,张 猛,方传勤 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨脑缺血对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)模型大鼠认知功能的影响。方法 大鼠分为脑缺血组、AD组、AD+脑缺血组和对照组。大鼠右侧纹状体注射内皮素1(endothelin-1,ET-1)建立脑缺血模型;右侧海马齿状回注射凝聚态$A\beta_{1-40}$建立AD模型;二者结合建立AD+脑缺血模型。穿梭箱和水迷宫实验检测各组大鼠的学习能力。结果 穿梭箱实验中AD+脑缺血组的主动、被动回避反应率最低,AD组次之,对照组最高($P<0.01$,$P<0.05$)。水迷宫定位航行实验中,AD+脑缺血组的平均逃避潜伏期最长,AD组次之,对照组最短($P<0.01$);空间搜索实验中AD+脑缺血组初次找到平台的时间最长,AD组次之,对照组最短($P<0.01$);AD+脑缺血组跨越平台的次数最少,AD组次之,对照组最多($P<0.01$)。结论 脑缺血后AD大鼠的认知功能下降更明显,脑缺血加剧了AD认知功能损害的进展。

关键词:阿尔茨海默病;脑缺血;认知功能;水迷宫;穿梭箱
中图法分类号:R338.6;R743.31;R749.16 文献标识码:A

Effect of cerebral ischemia on the cognitive function of Alzheimer's disease model of rats

LI Jing, ZHOU Hua-dong, WANG Yan-jiang, ZHANG Meng, FANG Chuan-qin (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cerebral ischemia on the cognitive function of rats with Alzheimer's disease (AD) and the role of cerebral ischemia in progression of cognitive damage of AD. Methods The male SD rats were divided randomly into 4 groups: the control group, the ischemia group, the AD group and the ischemia plus AD group. endothelin-1 (ET-1) injections was given to ischemia group into the right striatum; β_{1-40} injections to AD group in the right dentate gyrus, and both ET-1 and $A\beta_{1-40}$ injections to the ischemia plus group. The cognitive functions of the 4 groups of rats was detected by Morris water maze and shuttle box. Results The AAR% and PAR% of AD plus cerebral ischemia group were the lowest in the four groups in shuttle box experiment ($P<0.01$, $P<0.05$), followed by the AD group and the control group. In navigation test of Morris water maze, the average escape latency of AD plus cerebral ischemia group was the longest in the four groups ($P<0.01$). In spatial probe test of Morris water maze, the initial time taken to reach the hidden prior platform of AD plus cerebral ischemia group was the longest ($P<0.01$) and its frequency passing through the prior platform was the lowest ($P<0.01$), followed by the AD group and the control group. Conclusions The cognitive function of rats in the AD group decreased significantly after cerebral ischemia, which aggravated the cognitive damage of AD.

Key words: Alzheimer's disease; cerebral ischemia; cognitive function; Morris water maze; shuttle box

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是老年人中发病率高、危害性大的中枢神经系统退行性疾病,AD的防治是老年医学研究的重要课题。近年病理学研究表明脑缺血与AD间存在密切的联系:同时存在脑梗死的AD患者脑中,神经纤维缠结和淀粉样前体蛋白的形成都明显增加[1,2],脑缺血可能促进了AD的神经变性进程;1/3的临床诊断为AD的患者脑中同时存在脑梗死的病理改变[3,4]。根据上述依据可以得出一个假想,脑缺血对AD的发展起推动作用,这将对AD的治疗有重要的提示作用:积极防治脑缺血将减缓AD的进展。因此,本研究通过大鼠右侧海马齿状回注射凝聚态$A\beta_{1-40}$建立AD模型,右侧纹状体注射

作者简介:李 静,女,云南省个旧市人,博士,主治医师,主要从事脑血管病和老年性痴呆方面的研究。电话:13508365666,E-mail:lijingnaoer@163.com

收稿日期:2007-05-15;修回日期:2007-10-25

内皮素 1（endothelin-1，ET-1）建立脑缺血模型，二者结合建立 AD + 脑缺血模型，采用穿梭箱和水迷宫实验检测各组大鼠的认知功能，探讨脑缺血对 AD 大鼠认知功能的影响，了解脑缺血在 AD 认知功能损害进展中的作用，为 AD 的防治提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　雄性 SD 大鼠 40 只，体质量 250 ~ 300 g，第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2　主要试剂　$A\beta_{1-40}$（Sigma 公司），内皮素-1（Endothelin-1，ET-1）（Sigma 公司）。

1.1.3　主要仪器设备　Morris 水迷宫（中国医学科学院药物研究所）、电脑控制的穿梭箱系统（第三军医大学基础医学部生理学教研室）、江湾 Ⅰ 型 C 立体定向仪（上海江湾医疗器械厂）、5 μl 与 10 μl 微量注射器（上海精密仪器厂）。

1.2　实验方法

1.2.1　动物筛选与分组　将动物先进行 7 d 穿梭箱训练，筛选活跃、电击逃避迅速、习得率≥80% 的大鼠 40 只。分为脑缺血组、AD 组、AD + 脑缺血组和对照组共 4 组，每组 10 只。

1.2.2　模型制作　$A\beta_{1-40}$ 溶于无菌生理盐水（1 μg/μl），用前 37 ℃下孵育 1 周以上[5]。ET-1 溶于无菌双蒸水（0.01 μg/μl），注射前配制[6]。腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液（100 mg/kg）麻醉大鼠后，固定于立体定位仪上。

AD 组[5]：本实验选右侧海马齿状回（dentate gyrus，DG）背侧细胞带为注射区，参照大鼠脑立体定位图谱[7]，定位坐标为前囟后 3.3 mm，右侧旁开 2.0 mm，硬脑膜下 3.0 mm，门齿钩平面低于耳间线平面 2.4 mm。10 μl 微量注射器注射 $A\beta_{1-40}$ 溶液 10 μl，控制进针速度为 0.5 mm/min，注射速度为 1 μl/min，留针 10 min 以保证溶液充分弥散，然后缓慢撤针，控制退针速度为 1 mm/min。

脑缺血组[6-8]：ET-1 是一种强血管收缩剂，本实验选右侧纹状体为注射区制作临床常见的右侧基底节区多发性腔隙性脑梗死的脑缺血模型。定位坐标为前囟后 0.9 mm，右侧旁开 2.5 mm，硬脑膜下 4.5 mm。5 μl 微量注射器注射 ET-1 溶液 2 μl，控制进针速度为 0.5 mm/min，注射速度为 0.5 μl/min，留针 5 min，然后缓慢撤针，控制退针速度为 1 mm/min。

AD + 脑缺血组[8]：右侧海马齿状回注射 $A\beta_{1-40}$ 3 d 后再于右侧纹状体注射 ET-1。

对照组：重复上述所有手术，但不注射任何溶液。所有动物术后肌注青霉素（40 mg/kg，3 d）预防感染。

1.2.3　行为学检测　术后 2 周进行穿梭箱和水迷宫实验。

1.2.3.1　穿梭箱实验　电脑控制的穿梭箱系统由第三军医大学基础医学部生理学教研室研制[9]。以灯光为条件刺激，电击为非条件刺激。先将动物放入箱内暗适应 5 min，使其熟悉环境。开始时给予持续灯光刺激 5 s，如大鼠不逃至另一端（穿梭），则给予电击（箱底通电流 3 mA、频率 15 Hz 的电刺激），使动物逃至箱底不通电的另一端，此时电击停止，否则持续受电击 5 s。间隔 60 s 后再给予光刺激，开始下一轮训练。每次实验进行 20 轮光、电刺激。如大鼠在灯光刺激后即能完成穿梭动作称主动回避反应（active avoidance，AAR）；而经电刺激后才能完成穿梭动作称被动回避反应（passive avoidance，PAR）；不能完成动作则成为失败。连续进行 5 d。本实验中大鼠的条件性学习记忆能力以最后一次训练中完成 AAR、PAR 的次数与测试总次数的比值即 AAR、PAR 比率（AAR%、PAR%）代表。

1.2.3.2　Morris 水迷宫实验[10]　用于测试大鼠的空间学习记忆能力。实验分为两部分：①定位航行实验：实验开始前 1 d 让大鼠自由游泳 2 min，实验共历时 5 d，每天分上、下午两个时间段，每个时间段训练 4 次。训练时随机选择一个入水点，将大鼠面向池壁放入水中，记录大鼠寻找并爬上平台时所需时间即逃避潜伏期，每次训练间隔 60 s。如果大鼠在 120 s 内未找到平台，需将其引至平台，并将潜伏期记为 120 s。②空间搜索实验：第 5 天下午撤除水下平台，在同一入水点将大鼠面向池壁放入水中，记录其在 120 s 内初次找到原平台位置的时间和穿越原平台的次数。

1.3　统计学处理

统计各组大鼠 AAR 比率、平均逃避潜伏期、空间探索初次找到平台时间及穿越平台次数以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析和均数间多重比较。

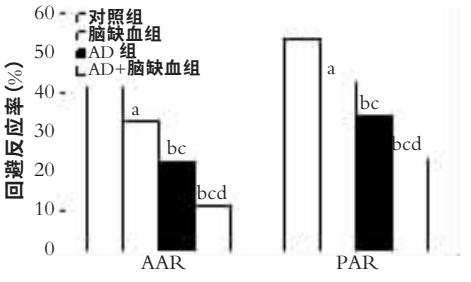
2　结果

2.1　术后动物一般情况

术后动物伤口恢复良好，AD 组反应较迟钝，脑缺血组及 AD + 脑缺血组早期运动减少，左后肢无力，走路身体向左侧倾倒或爬行或转圈，术后 7 d 基本恢复，无明显运动障碍。

2.2　穿梭箱实验结果

与对照组相比，脑缺血组、AD 组和 AD + 脑缺血组的主动和被动回避反应率均下降，其中 AD + 脑缺血组的 AAR 率下降最明显，AD 组次之，组间比较差异显著（$P < 0.01$，$P < 0.05$），见图 1。



a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与对照组比较；c：$P < 0.01$，与脑缺血组比较；d：$P < 0.01$，与 AD 组比较

图 1　大鼠穿梭箱测试结果

2.3　Morris 水迷宫实验结果

定位航行实验中，4 组的平均逃避潜伏期均日渐缩短，其中对照组的这种现象最明显，随着训练天数的增加，大部分对照组大鼠可以在很短时间内找到平台，后 3 组找到平台的时间随训练天数的增加而缩短相对少，其中 AD + 脑缺血组缩短最少，AD

组次之。从第3天起，AD+脑缺血组的平均逃避潜伏期最长，AD组次之，对照组最短，组间比较差异显著（$P<0.01$，表1）。空间搜索实验中，AD+脑缺血组初次找到原平台的时间最长，AD组次之，对照组最短；AD+脑缺血组跨越原平台的次数最少，AD组次之，对照组最多，组间比较差异显著（$P<0.01$，表2）。

表1 大鼠水迷宫中的定位航行实验结果（s，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	平均逃避潜伏期				
	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组	67.04±6.64	60.32±3.08	32.63±4.54	23.20±4.71	12.39±2.89
脑缺血组	66.88±6.89	64.34±4.93	44.09±6.95[a]	34.52±8.04[a]	25.46±5.08[a]
AD组	68.61±6.68	65.42±4.29	54.66±6.30[ab]	50.86±8.63[ab]	48.57±7.41[ab]
AD+脑缺血组	69.70±6.99	68.20±10.82	65.23±11.56[abc]	62.46±8.11[abc]	60.74±9.39[abc]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与脑缺血组比较；c：$P<0.01$，与AD组比较

表2 大鼠水迷宫中空间搜索实验结果（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	初次找到原平台的时间（s）	跨越原平台的次数（次）
对照组	9.90±3.17	17.31±4.28
脑缺血组	20.26±4.78[a]	11.13±3.22[a]
AD组	35.27±6.32[ab]	6.10±2.24[ab]
AD+脑缺血组	48.50±6.63[abc]	2.12±0.74[abc]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与脑缺血组比较；c：$P<0.01$，与AD组比较

3 讨论

经典理论认为[11]，AD是一种中枢神经系统进行性退行性疾病，其病因与遗传、β淀粉样蛋白斑的毒性作用、乙酰胆碱等递质损害等因素有关。然而近来研究认为[11-13]，脑缺血与AD间有着密切的联系，AD可能是一种继发于脑血管功能异常的血管性疾病。有研究[14,15]认为，脑血管病的一些血管危险因素同样可使AD的患病风险性明显增高，这些危险因素包括动脉粥样硬化、心房纤颤、高血压、冠心病和糖尿病等，血管源性危险因素在AD的演变过程中起着十分关键的作用。病理研究也显示[1-4]，60%～90%的AD病例脑中存在脑血管淀粉样变性、血管内皮细胞变性、脑室周围白质改变等脑血管病变，1/3的AD病例脑中有脑梗死病变，包括较大的脑梗死病灶和微梗死灶，提示AD和脑缺血有着相似的病理基础。

流行病学研究表明脑缺血可能加剧AD的进展。Heyman等[1]的较权威的CERAD研究发现，同时存在脑梗死的AD患者脑中，淀粉样前体蛋白和神经纤维缠结的形成都较无脑梗死的AD患者明显增加，表明脑缺血可能促进了AD的神经变性过程，加剧AD的进展。Snowdon等[2]关于AD与脑缺血关系的著名的“the Nun Study”发现，有脑梗死尤其是基底节区多发性腔隙性脑梗死的AD患者，其认知功能较单纯的AD患者下降更明显。Honolulu-Asia Aging Study[3]纳入3734例患者进行了脑血管病理改变与AD临床表现关系的研究，结果显示同时存在脑血管病理改变尤其是脑梗死的AD患者的认知功能损害更严重。从以上依据可看出，AD与脑缺血间有着密切的联系，脑缺血对AD的发展可能起推动作用，这将对AD的治疗有重要的提示作用，积极防治脑缺血将减缓AD的进展。但目前关于脑缺血对AD的影响缺乏基础实验的支持。Whitehead等[8]报道了基底节区多发性腔隙性脑梗死可加重AD大鼠的认知功能障碍，为进一步探讨脑缺血对AD的影响，本实验通过制作AD、脑缺血和AD+脑缺血模型，采用行为学的方法检测各组大鼠的认知功能，探讨脑缺血对AD大鼠认知功能的影响。

目前已有多种方法模拟老年痴呆疾患，转基因模型是AD模型的一个突破口，但费用昂贵。Aβ异常沉积是AD发病的关键，Aβ的神经毒性已得到体外和在体实验的广泛证实[5]，海马内局部注射Aβ已是一种较为成熟的制作AD模型的方法。凝聚态$A\beta_{1-40}$片段长，不易降解，毒性大，所以我们选择右侧海马齿状回注射凝聚态$A\beta_{1-40}$制作AD模型，从穿梭箱和水迷宫实验可以看出，Aβ注射组的条件性和空间学习记忆能力较对照组明显下降，较成功的模拟了AD的认知功能损害。从Snowdon等[2]的研究中可以看出脑缺血加重了AD的认知功能损害，其中基底节区、深部脑白质和丘脑多发性腔隙性脑梗死对AD认知功能的影响作用较脑叶大面积梗死还要强。因此，本研究选用基底节区多发性微梗死的脑缺血模型。ET-1是一种强血管收缩剂，Gelb等[16]的研究发现ET-1造成的脑缺血在大约1 h后可恢复再灌注，因而造成的梗死面积较小，同时对麻醉状态下动物注射ET-1造成的梗死面积更小。因此，ET-1目前已普遍应用于制作腔隙性脑梗死的等脑缺血模型，大鼠纹状体（基底节区）注射不同剂量的ET-1可制备弥漫性皮质下微梗死、基底节区局灶性脑梗死、基底节区多发性腔隙性脑梗死等脑缺血模型[6]。本实验即参考Whitehead等[8]的方法，采用右侧纹状体注射ET-1制作基底节区多发性腔隙性脑梗死的脑缺血模型。本实验拟研究脑缺血对AD进展的影响，所以我们先注射$A\beta_{1-40}$，3 d后再注射ET-1，观察脑缺血对AD大鼠认知功能的影响。因术中创伤可能对认知功能有一定影响，因此设立了执行所有手术操作但不注射任何药物的对照组。本实验显示，AD+脑缺血大鼠的AAR、PAR率下降较AD大鼠和脑缺血大鼠更明显，提示脑缺血加重了AD大鼠的条件性学习记忆能力损害。水迷宫的定位航行实验中，AD+脑缺血组大鼠的平均逃避潜伏期都较AD大鼠和脑缺血大鼠长；空间探索实验中AD+脑缺血组初次找到

原平台的时间最长,跨越原平台的次数也较其余两组明显减少,提示脑缺血加剧了 AD 大鼠的空间学习记忆能力损伤。与 Whitehead 等[8]的研究结果相似。

因此,我们的实验结果表明,脑缺血加剧了 AD 大鼠的认知功能损害,脑缺血对 AD 的发展起推动作用,提示积极防治脑缺血将减缓甚至阻止 AD 的进展,这具有重要的临床意义。此外,本实验建立的动物模型是可行的,具有死亡率低、周期短的优点,有利于今后研究工作的开展。

参考文献:

[1] Heyman A, Fillenbaum G G, Welsh-Bohmer K A, *et al*. Cerebral infarcts in patients with autopsy-proven Alzheimer's disease: CERAD, part XVIII. Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease [J]. Neurology, 1998, 51(1): 159 – 162.

[2] Snowdon D A, Greiner L H, Mortimer J A, *et al*. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study [J]. JAMA, 1997, 277(10): 813 – 817.

[3] Petrovitch H, Ross G W, Steinhorn S C, *et al*. AD lesions and infarcts in demented and non-demented Japanese-American men [J]. Ann Neurol, 2005, 57(1): 98 – 103.

[4] Zekry D, Duyckaerts C, Moulias R, *et al*. Degenerative and vascular lesions of the brain have synergistic effects in dementia of the elderly [J]. Acta Neuropathol, 2002, 103(5): 481 – 487.

[5] Huang H J, Liang K C, Chen C P, *et al*. Intrahippocampal administration of A beta(1 – 40) impairs spatial learning and memory in hyperglycemic mice [J]. Neurobiol Learn Mem, 2007, 87(4): 483 – 494.

[6] Martinez-Murillo R, Fernandez A P, Serrano J, *et al*. The nitric oxide donor LA 419 decreases brain damage in a focal ischemia model [J]. Neurosci Lett, 2007, 415(2): 149 – 153.

[7] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 2nd ed. Orlando Florida: Academic Press Inc, 1986: 26 – 42.

[8] Whitehead S N, Hachinski V C, Cechetto D F. Interaction between a rat model of cerebral ischemia and beta-amyloid toxicity: inflammatory responses [J]. Stroke, 2005, 36(1): 107 – 112.

[9] 赵邦云,黎海蒂,李希成,等. 猕猴行为训练自动控制系统的设计与实现 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(13): 1900 – 1901.

[10] Kumar A, Seghal N, Naidu P S, *et al*. Colchicines-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type [J]. Pharmacol Rep, 2007, 59(3): 274 – 283.

[11] Zlokovic B V. Vascular disorder in Alzheimer's disease: role in pathogenesis of dementia and therapeutic targets [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(12): 1553 – 1559.

[12] Koistinaho M, Koistinaho J. Interactions between Alzheimer's disease and cerebral ischemia-focus on inflammation [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 48(2): 240 – 250.

[13] Kalaria R N. The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2000, 21(2): 321 – 330.

[14] Launer L J, White L R, Petrovitch H, *et al*. Cholesterol and neuropathologic markers of AD: a population-based autopsy study [J]. Neurology, 2001, 57(8): 1447 – 1452.

[15] Reitz C, Patel B, Tang M X, *et al*. Relation between vascular risk factors and neuropsychological test performance among elderly persons with Alzheimer's disease [J]. J Neurol Sci, 2007, 257(1 – 2): 194 – 201.

[16] Gelb A W, Bayona N A, Wilson J X, *et al*. Propofol anesthesia compared to awake reduces infarct size in rats [J]. Anesthesiology, 2002, 96(5): 1183 – 1190.

（编辑　郭建秀）

（上接 1263 页）

平均随访时间 6 个月(3 ~ 12 个月),根据 Macnab 疗效评定标准,总有效率 84%(102/122),其中显效 61%(74/122),有效 24%(28/122),无效 15%(20/122)。

3　讨论

O_3对髓核的破坏作用有利于减轻自身免疫反应,加之其抗炎和镇痛作用,故对疼痛的控制作用优良。我们严格按照手术适应证选择病例,制定规范的操作程序并有固定人员操作,术后严格管理,对发生的病情变化随时处理。在推注臭氧时要缓慢、多方向和多角度注射,最后注射在突出部分,对有下肢神经症状者将针退至椎间孔处注射 5 ~ 10 ml[3],所以本组有效率高达 84%。对于椎间盘突出明显,注射后效果不佳者 1 周后行二次注射。Marco[4]也提倡首次注射后 1 周行二次注射提高疗效。何晓峰[5]报道 78 例患者行二次注射能明显提高疗效。本组病例共 12 例一次注射后疼痛恢复不理想,于 1 周后行二次注射疼痛缓解,有 3 例患者于 1 个月后行二次注射症状完全消失。

临床工作中我们发现部分患者症状减轻或消失,但复查 CT 或 MRI 其椎间盘仍然突出,甚至与术前无差别,其机制需要进一步探讨。本组病例随访的时间在 1 年内,其远期疗效还需要大量的病例观察。

关键词:臭氧;腰椎椎间盘突出症
中图法分类号:R816.8　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 俞志坚,何晓峰,陈　勇,等. 经皮腰椎间盘内臭氧注射的动物实验研究 [J]. 中华放射学杂志, 2002, 36(4): 366 – 369.

[2] 俞志坚,何晓峰,何仕成,等. 臭氧治疗腰椎间盘突出症:盘内臭氧分布与疗效 [J]. 临床放射学杂志, 2003, 22(10): 869 – 872.

[3] 马光辉,张国民,杨儒谋,等. 臭氧治疗腰椎间盘突出症(附 86 例临床报告) [J]. 实用临床医学, 2003, 4(5): 36 – 37.

[4] Marco L, Simonetti L, Barbara C. The effects of ozone on the nucleus pulposus: pathological data on one surgical specimen [J]. Riv Neuroradiol, 2001, 14(Suppl 1): 57 – 59.

[5] 何晓峰,李彦豪,陈汉威,等. 臭氧治疗椎间盘突出症 600 例临床疗效分析 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2005, 2(5): 338 – 341.

[6] 华双一,徐仁良,祁　波. 经皮髓核钳夹术联合臭氧注射术治疗腰椎间盘突出症临床价值 [J]. 介入放射学杂志, 2005, 14(3): 281 – 283.

（编辑　栾　嘉）