维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0681-03

单胺氧化酶 B 在神经元退行性变模型中的意义研究

袁　野,熊　缨,杨俊卿,何百成,周岐新

(重庆医科大学基础医学院药理教研室,重庆　400016)

【摘　要】目的:研究不同神经元退行性变动物模型中单胺氧化酶 B(MAO B)活性变化,并探讨其意义。方法:NIH 雄性小鼠,分别建立脑缺血再灌注、铝过负荷及一氧化碳中毒神经元退行性变模型。采用 Morris 水迷宫和跳台实验进行学习记忆能力测试,HE 切片染色光镜下观察海马病理变化和以市售标准试剂盒测定脑匀浆 MAO B 活性。结果:各模型组小鼠较相应对照组学习记忆能力显著降低,海马切片可见神经元核固缩和细胞丢失等退行性改变。脑缺血再灌注模型组 MAO B 活性与对照组相比无显著变化,但铝中毒和一氧化碳中毒模型小鼠 MAO B 活性较对照组显著升高。结论:MAO B 活性异常升高在各种神经元退行性变动物模型中不具有普遍性意义。脑缺血再灌注模型可能适用于痴呆研究,而一氧化碳中毒和铝过负荷模型可能适用于痴呆和锥体外系疾病研究。

【关键词】神经元退行性变;动物模型;单胺氧化酶 B

【中国图书分类号】R743.31　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2006-03-21

Significance of monoamine oxidase B activity in neurodegenerative models

YUAN Ye

(*Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of monoamine oxidase B (MAO B) activity in variety of neurodegenerative animal models and to discuss their significance. *Methods*: The neurodegenerative models were built with NIH male mice by means of the cerebral ischemia-reperfusion, aluminum overloading and carbon monoxide intoxication, respectively. The learning and memory ability of mice, MAO B activity of brain homogenates, and pathomorphological changes of hippocampal slices were determined using Morris maze and Step-down tests, MAO B kit, as well as microscopic observation with HE stain. *Result*: Although the significantly decreasing learning and memory ability and loss and karyopyknosis of hippocampal neurons were observed in three groups of animal models, compared with control group, the changes of MAO B activity were quite different. There was no significant change in cerebral ischemia-reperfusion model, but the unusual elevation was found in both aluminum overloading model and carbon monoxide intoxication model. *Conclusion*: The abnormal increase of MAO B does not occur in a variety of neurodegenerative animal models, which may indicate that the cerebral ischemia-reperfusion model can be used in the research of dementia and aluminum overloading model and carbon monoxide intoxication model can be used in the research of both dementia and extrapyramidal disease.

【Key words】Neurondegeneration; Animal model; Monoamine oxidase B

神经元退行性疾病是威胁人类健康的一大类疾病,包括阿尔采默茨病、帕金森病等。其病因和发病机制复杂,一直是神经科学研究的重点。MAOB 是一种线粒体膜复合酶，通过 C 端的跨膜多肽结合于线粒体外膜[1],在多巴胺的代谢途径中发挥作用[2]。本文的目的在于观察三种神经元退行性变动物模型中脑单胺氧化酶 B 活性变化,为深入研究不同神经元退行性变疾病机制及寻找有效的防治措施奠定基础。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1 动物　I 级 NIH 雄性小鼠,体重 25~30g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂　单胺氧化酶 B 检测试剂盒购自南京建成生物试剂公司。

1.1.3 主要仪器　DMS-2 Morris 水迷宫系统和 WCX-2 跳台

作者介绍:袁　野(1976-　),男,博士生,
主要研究方向:神经药理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

仪,中国科学院药物研究所研制。

1.2 实验方法

1.2.1 脑缺血再灌注模型 小鼠分为两组:(a)手术组:参照李梨[3]手术方法进行,简述如下。以 4%水合氯醛 0.01 ml/g 麻醉小鼠,仰卧固定。手术分离双侧颈总动脉和右侧颈总静脉。以导管经颈总静脉向心脏方向插入,缓慢抽取相当于小鼠理论血量的 40%(25 g 小鼠抽血 0.83 ml)。以无创血管夹夹闭双侧颈总动脉。20 min 后松开双侧血管夹,缓慢回输血液。结扎右侧颈总静脉,缝合创口。(b)假手术组:以 4%水合氯醛腹腔注射麻醉,仰卧固定。手术分离双侧颈总动脉和右侧颈总静脉,暴露 20 min 后,缝合创口。于手术后 20 天进行检测。

1.2.2 铝过负荷模型 参照 Toyoda 法制作不锈钢导管[4]和塑料内芯。将小鼠以 4%水合氯醛 0.01 ml/g 麻醉,俯卧固定。剪去前囟周围头皮并刮去骨膜,于中线旁 1.3 mm,前囟后 0.3 mm 择点钻孔(注意勿伤及脑膜和脑组织)。然后将导管沿孔垂直插入 2 mm,用牙托粉和 502 胶水混合物固定于颅骨上。术后让小鼠休息 1 周,使其恢复。给药时只需拔出内芯,将连接于微量注射器针头上自制相应口径针管沿外套插入即可(该管的制作应保证下端仅超出外套下沿 0.5 mm 以内)。注射过程中应注意无菌操作,给药结束后再将内芯塞紧。小鼠分为两组:(a)氯化铝组:连续给浓度 0.125%氯化铝,每天 1 次,每次 3 μl,连续给药 5 天。(b)空白对照组:生理盐水,每天 1 次,连续 5 天。20 天后即进行检测。

1.2.3 一氧化碳中毒模型 小鼠分为两组:(a) 空气对照组:小鼠腹腔注射空气 100 ml/(kg·天),连续注射 7 天。(b)一氧化碳组:小鼠腹腔注射新鲜制备的一氧化碳 100 ml/(kg 天),连续注射 7 天。第 20 天进行检测。

1.2.4 MAOB 活性检测 参照《药理实验方法学》单胺氧化酶 B 活性检测[5]进行,简述如下。断颈处死小鼠,冰面分离大脑皮层和海马,于冰冷生理盐水中漂洗除去血液。冰浴条件下匀浆,并以冰冷生理盐水稀释致 10%脑匀浆。采用单胺氧化酶 B 检测试剂盒,以紫外比色法检测 MAOB 活性。

1.3 学习记忆功能测试

1.3.1 Morris 水迷宫 实验前动物自由游泳 2 min。正式实验每天训练 4 次,每次 120 s,随机从东、西、南、北 4 个入水点选择 1 个,将动物面向池壁放入水中,记录动物寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期。每次训练后休息 15 min。如果动物在 120 s 内未找到平台,将其引至平台,逃避潜伏期记为 120 s;动物在平台上停留 20 s。第 5 天将动物随机放入任一象限,记录其寻找并爬上平台的时间,即为寻台时间。

1.3.2 跳台实验 将小鼠放入跳台仪测试箱中让其熟悉环境 3 min,然后接通 36 V 交流电,持续 10 min 后取出小鼠;在此期间小鼠学会被动跳上跳台以逃避电击。24 h 后进行记忆测试(此时跳台不通电),将训练过的小鼠放在跳台上,测试时间为 300 s。记录小鼠下台时间,潜伏期超过上限记为 300 s。

1.4 病理切片制作

小鼠麻醉后,用 3.5%甲醛(pH 7.2 的 PBS 配制)在体灌注固定,取出大脑,常规脱水、石蜡包埋、切片。切片厚 4 μm,HE 染色,光镜下观察海马病理变化。

1.5 统计方法

采用 SPSS11.5 统计软件进行。

2 结 果

2.1 小鼠学习记忆功能变化

不同神经元退行性变模型小鼠学习记忆能力变化见表 1。Morris 水迷宫实验中模型组寻台潜伏期较对照组显著延长 $P<0.05$。跳台实验中模型组下台潜伏期较对照组显著缩短 $P<0.05$。上述实验结果均提示模型组学习记忆能力较对照组降低。

表 1 不同神经元退行性变模型中小鼠学习记忆能力变化(n=7~13,$\bar{x}\pm s$)

	寻台潜伏期(s)		下台潜伏期(s)	
	对照组	模型组	对照组	模型组
脑缺血再灌注	14.33 ± 4.84	33.33 ± 15.22*		/
脑室人注射氯化铝	12.50 ± 9.40	82.60 ± 35.90**	297.3 ± 11.0	221.7 ± 35.3*
一氧化碳中毒	/		108.0 ± 124.0	62.0 ± 181.0**

与对照组相比,*$P<0.05$,**$P<0.01$ 与对照组相比,*$P<0.05$,**$P<0.01$

2.2 小鼠海马病理形态学变化

结果见图 1。显示各对照组小鼠皮层和海马神经元结构清楚、形态完整、细胞排列整齐、层次分明。但各模型组海马各区均可见神经元缺失、细胞核固缩、细胞排列混乱、层次减少(图 1)。

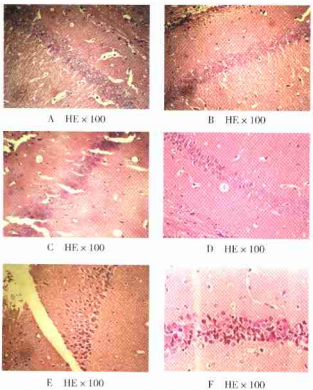
2.3 MAO B 活性变化

各模型组 MAO B 活性变化见表 2。显示与对照组比,脑缺血再灌注模型鼠脑 MAO B 活性无明显变化。但是铝过负荷模型鼠和一氧化碳中毒模型鼠脑 MAO B 活性明显增加。

3 讨 论

流行病学调查提示导致神经元退行性变的危

维普资讯 http://www.cqvip.com



A HE×100　B HE×100
C HE×100　D HE×100
E HE×100　F HE×100

图 1　不同神经元退行性变模型小鼠海马切片病理形态学改变
（A 为铅中毒对照组；B 为脑缺血再灌注对照组；C 为一氧化碳中毒对照组；D 为铅中毒组；E 为脑缺血再灌注组；F 为一氧化碳中毒组。）

表 2　各模型鼠脑匀浆 MAO B 活性变化

单位：U/h/ml/mg protein（n =7~8，$\bar{x}\pm s$）

	对照组	模型组
脑缺血再灌注	5.53±0.78	3.83±0.90
铅过负荷	1.55±0.21	7.94±0.01**
一氧化碳中毒	3.80±0.80	8.50±1.20**

与相应对照组比，**P <0.01

险因素包括老龄、金属离子中毒、Aβ 代谢异常、心脑血管疾病等。各种病因均可导致体内氧化应激与抗氧化应激的失衡，自由基增加。研究表明自由基可损伤细胞启动细胞程序性死亡[6]。海马是最容易遭受损伤的脑区之一。在我们多年的神经元退行性变模型研究中深切体会到，虽然病理形态学变化是模型是否成功最重要的标准，但是一旦出现了明显的病理变化，药物治疗常常无效。因此，如何在明显病理变化出现前及早发现关键性生物化学指标和行为学指标改变，对预防和治疗神经元退行性变疾病具有重要意义。

为此，我们设计了一氧化碳中毒、铅过负荷和脑缺血再灌注三种不同的导致神经元退行性变动物模型。我们的研究发现三种动物模型均出现明显被动学习记忆能力和空间识别能力显著降低，海马各区域显示程度和分布不同的神经细胞核固缩和神经元缺失现象，提示神经元退行性变模型建立成功。与此同时，我们还发现在进行行为学测试时，一些一氧化碳中毒模型鼠和铅过负荷模型鼠常因突然的噪声、捉拿和强光等刺激而产生惊厥；但脑缺血再灌注模型鼠从未有此情况发生。我们的研究还显示，一氧化碳中毒模型鼠和铅负荷模型鼠 MAO B 活性显著高于对照组，而脑缺血再灌注模型鼠无此变化。

有临床研究报道，在老年人神经组织内 MAO B 水平升高 3 倍[7]。AD 患者前额皮质 MAO B 活性比正常者升高 16%[8]。阿尔采默茨病患者脑组织内 MAO A 和 MAO B 的 mRNA 水平明显升高[9]。尸检发现 ALS 患者脊柱匀浆中 MAO B 活性显著升高。ALS 患者的皮质脊髓通路、运动神经元区域和腹白质的 MAO B 表达也显著升高[10]。MAO B 抑制剂丙炔苯丙胺能完全阻断 MPP+诱导的神经毒性，其对亚帕金森综合症患者有神经保护作用[11]。动物实验也证明 MAO B 基因敲除的小鼠对致帕金森神经毒素 MPTP 具有耐受性[12]。相反在多种脑血管疾病急性期患者血浆 MAOB 活性降低[13]，脑血浆单胺氧化酶含量亦降低[14]。沙鼠脑缺血再灌注实验发现缺血和再灌注 1h 后 MAOB 活性均显著降低[15]。

虽然脑缺血再灌注和一氧化碳中毒及铅负荷致神经元退行性均显示明显的学习记忆功能下降和海马病理改变，但后两个模型出现显著 MAOB 活性升高而前者无明显变化。上述事实提示脑缺血再灌注和一氧化碳中毒及铅负荷可能分属两种不同的神经元退行性变类型，并可能分别涉及不同的损伤机制和影响不完全相同的神经元。一氧化碳中毒和铅中毒引发 MAOB 活性显著升高，提示其病变还可能累及包括锥体外系在内的区域，如黑质和纹状体。为此，我们认为一氧化碳中毒及铅负荷模型既用作为痴呆症研究，也可用作帕金森病等锥体外系疾病的动物模型。而脑缺血再灌注模型则可能仅限于痴呆的研究应用。MAOB 活性异常升高可以作为一氧化碳中毒和铅中毒致神经元退行性病变的早

（下转第 714 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

农村卫生工作是解决“三农”问题的重要措施之一，它关系到保护农村生产力和振兴农村经济的大局，关系到农民生活质量的提高和农村社会进步，关系到国家的长治久安。推行农村卫生改革又是关系到我国建设小康社会、构建和谐社会的成败关键。从本文对三峡库区贫困地区忠县农村贫困居民就医行为的定性研究中，可以看到农村卫生改革[5]主要应包括以下几个方面：一、发展农业经济，提高农民收入，增强其抵御疾病风险地能力，这是卫生改革的经济基础。二、加快新型农村合作医疗制度试点，进一步加强和完善新型农村合作医疗保健制度，这是卫生改革的中心环节。新型农村合作医疗制度是未来农村基本医疗保障制度的雏形。这项制度对于缓解农民医疗的经济负担，提高农民医疗服务水平发挥了重要作用。国务院决定，从 2006 年起提高政府对参加合作医疗农民的补助经费标准，并逐年扩大试点范围，到 2008 年在全国基本推行这项制度。其他主要策略还包括：第三、加强农村卫生基础设施建设。目前，我国不同区域的农村卫生基础设施条件差距很大。经济发达地区农村卫生的基础设施条件比较完备，功能比较齐全；中部地区农村一般具备必要的基础设施，但缺乏医疗设备和高素质卫生技术人员；西部地区大多缺乏基本的医疗卫生服务条件[5]，乡镇卫生院和村卫生室危房很多，医疗设备条件差，不能为农民提供较好的基本医疗服务。第四，加强农村卫生人才队伍建设，特别是加强乡村医生的培训，是广大农民的迫切需要。第五，对农民进行健康促进，提高他们卫生服务利用的主动性。

（通讯作者：重庆医科大学公共卫生学院王润华教授）

参 考 文 献

[1] 扬 松，刘建平. 三峡库区移民卫生防病与保健任重道远[J].医学与哲学，1999；20（3）：61-62.

[2] 张仁伟，杨土保.我国农村贫困地区医疗服务及利用的影响因素分析[J].中国农村卫生事业管理，2000；20（2）：3-7.

[3] 韩 俊， 罗 丹.当前农村医疗卫生服务状况调查与分析[J].改革，2005；2（2）：5-18.

[4] 张 良，陈俊国.20 世纪 90 年代以来我国农村卫生改革之历程[J].西南国防医药，2005；15（6）：667-668.

[5] 陈 华，何绍斌，孙 静，等. 湖北省宜昌地区农村居民卫生服务需求与利用调查[J].中国农村卫生事业管理，2003；23（2）：32-35.

（上接第 683 页）

期检测指标。

参 考 文 献

[1] Mitoma J，Ito A. Mitochondrial targeting signal of rat liver monoamine oxidase B is located at its carboxy terminus[J].J Biochem，1992；111（1）：20-24.

[2] Riederer P，Konradi C，Hebenstreit G，et al. Neurochemical perspectives to the function of monoamine oxidase [J].Acta Neurol Scand Supply，1989；126：41-45.

[3] 李 梨，郭建增，周岐新，等.脑缺血再灌致小鼠学习记忆障碍模型的建立[J].重庆医科大学学报，2005；30（3）：412-415.

[4] Toyoda M，Satio H，Matsuki N. Nitric oxide but not carbon monoxide is involved in spatial learning of mice [J].Jpn J Pharmacol，1996；71：205-211.

[5] 徐叔云，卞如濂，陈 修，等.药理实验方法学[M].第 3 版.北京市丰台区：人民卫生出版社，2002.526-529.

[6] Youdim MB，Riederer P.Understanding Parkinson's disease[J].Sci Am，1997；276（1）：52-59.

[7] Fowler CJ，Wiberg A，Oreland L，et al. The effect of age on the activity and molecular properties of human brain monoamine oxidase[J].J Neural Transm，1980；49（1-2）：1-20.

[8] Kennedy BP，Ziegler MG，Alford M，et al. Early and persistent alterations in prefrontal cortex MAO A and B in Alzheimer's disease[J].J Neural Transm，2003；110（7）：789-801.

[9] Emilsson L，Saetre P，Balciuniene J，et al.Increased monoamine oxidase messenger RNA expression levels in frontal cortex of Alzheimer's disease patients[J].Neurosci Lett，2002；326（1）：56-60.

[10] Jossan SS，Ekblom J，Aquilonius SM，et al. Monoamine oxidase-B in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis studied by quantitative autoradiography[J].J Neural Transm Suppl，1994；41：243-248.

[11] Henchcliffe C，Schumacher HC，Burgut FT.Recent advances in Parkinson's disease therapy：use of monoamine oxidase inhibitors [J].Expert Rev Neurother，2005；5：811-821.

[12] Shih JC，Chen K，Ridd MJ.Monoamine oxidase：from genes to behavior[J].Annu Rev Neurosci，1999；22：197-217.

[13] Ishizaki F.Plasma benzylamine oxidase activity in cerebrovascular disease[J].Eur Neurol，1990；30（2）：104-107.

[14] Il'ichevaRF，BurdGS，SheliakinaLA，et al.Stateofserotonin—monoamine oxidase and histamine—diamine oxidase systems in circulating blood in ischemic strokes [J].Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova，1980；80（8）：1164-1170.

[15] Ishii H，Stanimirovic DB，Chang CJ，et al.Dopamine metabolism and free-radical related mitochondrial injury during transient brain ischemia in gerbils[J].Neurochem Res，1993；18（11）：1193-1201.