DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.022
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
714 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0714-03

血管性痴呆大鼠脑中生长抑素和乙酰胆碱含量的变化

张莉莉[1],王景周[1],刘文生[2],陈曼娥[1] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042;[2]河南省原阳县红十字会医院脑血管内科,原阳 453500)

提 要:目的 探讨生长抑素和乙酰胆碱含量在血管性痴呆中的变化规律及意义。方法 建立大鼠血管性痴呆模型,应用AAR比率作为判断大鼠学习记忆功能的指标;应用放射免疫分析方法测定大鼠不同脑区生长抑素和乙酰胆碱含量,并用胆碱酯酶抑制剂石杉碱甲进行干预。结果 血管性痴呆大鼠脑中生长抑素和乙酰胆碱含量明显降低,应用石杉碱甲可改善这一现象。结论 血管性痴呆的发生与脑缺血后生长抑素含量的降低有关,生长抑素可能通过与乙酰胆碱的相互调节作用参与血管性痴呆的病理过程。

关键词:血管性痴呆;生长抑素;乙酰胆碱;石杉碱甲
中图法分类号:R322.81;R749.16;R971.9 文献标识码:A

Changes of somatostatin and acetylcholine contents in vascular dementia rats

ZHANG Li-li[1], WANG Jing-zhou[1], LIU Wen-sheng[2], CHEN man-e[1] ([1]Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Department of Cerebrovascular Diseases, Yuanyang Red Cross Hospital, Yuanyang 453500, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the changes and significance of somatostatin (SS) and acetylcholine (Ach) contents in vascular dementia rats. **Methods** Model of vascular dementia rats was established. Active avoidance response (AAR) ratio was used as the index for the judgement of the learning and memory abilities of vascular dementia rats. The SS and Ach contents in different cerebral sections of rats with and without intervention of huperzine A were determined by radioimmunoassay. **Results** A remarkable decrease in SS and Ach contents was found in vascular dementia rats, which could be reversed by intervention of huperzine A. **Conclusion** The decreased SS content in cerebrum after ischemia is related with vascular dementia. SS may be involved in the pathological process of vascular dementia through the mutual regulation with Ach.

Key words: vascular dementia; somatostatin; acetylcholine; huperzine A

血管性痴呆是脑血循环障碍引起的脑机能降低,是老年期痴呆的一种重要类型,其确切发病机制尚未明了。许多神经肽参与学习记忆过程调节,其中生长抑素(somatostatin, SS)的研究受到广泛重视。SS是一种脑肠肽,广泛分布于中枢神经系统和胃肠道组织中,产生多种行为效应。最近研究表明,SS可促进学习记忆活动,但其具体作用机制尚未明了。一些作者认为,SS对学习记忆的作用不是孤立的,与乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)等多种神经递质相互影响。本实验采用放免(radioimmunoassay, RIA)方法测定血管性痴呆大鼠多脑区SS和Ach的含量,并应用抗胆碱酯酶药物石杉碱甲提高乙酰胆碱水平,初步探讨SS在学习记忆过程中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型

1.1.1 实验动物分组 实验动物由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。选用12~15月龄Wistar大鼠36只,体质量280~400 g,随机分为假手术组、模型组、干预组,每组12只大鼠。组间鼠龄、性别、体质量无统计学差异。各组大鼠术后生存1个月,进行各项指标测定。

1.1.2 动物模型制作 血管性痴呆动物模型制作采用Pulsinelli的4血管闭塞(4-vessel occlusion, 4VO)改良法[1]。大鼠术前12 h禁食,不禁水。10%水合氯醛(5 ml/kg)腹腔麻醉,动物仰卧固定,颈前正中切口,钝性分离暴露双侧颈总动脉,缝合颈部皮肤。将动物俯卧位固定,颈背部正中切口,分离、暴露第一颈椎的翼小孔,沿翼小孔烧灼双侧椎动脉,阻断血供。24 h后以动脉夹反复夹闭双侧颈总动脉,造成全脑缺血,每次5 min,间隔1 h,共3次。手术过程维持动物肛温37~38 ℃。模

基金项目:重庆市科委科研基金资助项目(2001)
Supported by the Scientific Committee of Chongqing (2001)
作者简介:张莉莉(1973-),女,山东省东阿县人,硕士,主治医师,主要从事急性脑血循环障碍基础与临床方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68757363
收稿日期:2003-04-22;修回日期:2003-09-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

型制作成功的标准: 夹闭双侧颈总动脉 1 min, 动物对外界刺激失去反应, 呼吸频率变快, 翻正反射消失。

假手术组除不烧灼双侧椎动脉, 不夹闭双侧颈总动脉外, 其余处理同模型组; 干预组于模型制作的同时给予石杉碱甲(Huperzine A)0.3 mg/kg, 胃管注入, 连续给药 30 d。各组动物分别于术后 30 d 进行穿梭箱成绩测试后处死, 观察各项指标。

1.2　实验大鼠的学习记忆能力测试

采用第三军医大学大坪医院野战外科研究所第五研究室提供的穿梭箱系统。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, 给予持续灯光刺激 5 s 后通直流电进行电击(电击强度 30 V, 50 Hz), 使动物逃至箱底不通电的另一端。大鼠在灯光刺激后即能完成穿梭动作为主动回避反应(active avoidance response, AAR)。每次测试进行 20 次光、电刺激, 以 AAR 比率(AAR 次数总和与总测试次数的比值)代表大鼠的学习记忆能力, 并记录大鼠出现主动回避反应的潜伏期。所有大鼠在模型制作前均经穿梭箱训练 7 d, 测试成绩 AAR 比率大于 80% 者入选。各组大鼠术前的 AAR 比率无统计学差异。术后 23 d, 重新做穿梭箱训练 7 d, 测试成绩。

1.3　SS 和 Ach 的测定

将手术后 30 d 的大鼠迅速断头取脑, 立即放入生理盐水中煮沸 5 min, 分离出双侧额叶、颞叶、海马、丘脑、纹状体, 分别称湿重, 移入匀浆管中充分匀浆, 室温下放置 100 min 后, 4 ℃下 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液置于 −70 ℃冰箱保存待测。

SS RIA 试剂盒购自第二军医大学神经生物学教研室, Ach 放免试剂盒购于军事医学科学院。样品测定严格按照说明书进行, 然后在 γ 计数器上测定其放射性, 测定每 mg 湿重脑组织中的 SS 和 Ach 含量。

1.4　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行方差分析及组间多重比较。采用直线相关分析的方法测定 SS 和 Ach 之间的相关性。

2　结果

2.1　大鼠学习记忆能力测试结果

假手术组大鼠的 AAR 比率稳定, 潜伏期较短; 模型组大鼠 AAR 比率较假手术组明显下降, 潜伏期亦显著延长($P<0.01$)。应用石杉碱甲的干预组大鼠 AAR 比率有明显提高, 潜伏期缩短, 与模型组相比有显著性差异($P<0.01$), 见表 1。

表 1　各组大鼠学习记忆能力

Tab 1　Learning/memory abilities of rats in each group

Group	AAR ratio(%, $\bar{x} \pm s$)	Latent period(s)
Sham-operation group	92.0±5.5	2.0±0.6
Model group	43.5±4.1 *	3.8±0.9 *
Intervention group	64.0±6.7 #	2.3±0.5 #

*: $P<0.01$, *vs* sham-operation group; #: $P<0.01$, *vs* model group

2.2　各组大鼠不同脑区 SS 含量

假手术组大鼠各脑区 SS 含量较高, 模型组大鼠各脑区内 SS 含量显著降低($P<0.01$), 干预组大鼠各脑区的 SS 含量有明显升高, 与模型组相比有显著性差异($P<0.01$), 见表 2。

表 2　各组大鼠脑内 SS 含量($\bar{x} \pm s$, pg/mg)

Tab 2　SS content in cerebra of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, pg/mg)

Group	Cortex of frontal lobe	Cortex of temporal lobe	Hippocampus	Thalamus	Striatum
Sham-operation group	165.6±29.1	238.7±25.5	159.2±19.9	187.1±21.0	191.5±17.2
Model group	84.3±16.7 *	147.2±18.0 *	72.5±13.3 *	103.2±16.8 *	98.6±11.9 *
Intervention group	133.4±22.8 #	196.6±20.8 #	115.4±15.1 #	138.7±21.3 #	132.3±18.5 #

*: $P<0.01$, *vs* sham-operation group; #: $P<0.01$, *vs* model group

2.3　各组大鼠不同脑区内 Ach 含量

假手术组大鼠各脑区 Ach 含量较高, 模型组大鼠各脑区内 Ach 含量显著降低($P<0.01$), 干预组大鼠各脑区的 Ach 含量有明显升高, 与模型组相比有显著性差异($P<0.01$), 见表 3。

表 3　各组大鼠脑内 Ach 含量($\bar{x} \pm s$, pmol/mg)

Tab 3　Ach content in cerebrum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, pg/mg)

Group	Cortex of frontal lobe	Cortex of temporal lobe	Hippocampus	Thalamus	Striatum
Sham-operation group	13.4±1.6	14.2±1.3	26.7±1.8	17.8±1.3	16.6±1.7
Model group	4.6±0.5 *	6.4±0.7 *	10.2±1.0 *	9.1±0.5 *	6.7±0.6 *
Intervention group	9.5±1.1 #	11.0±1.6 #	20.5±1.7 #	13.8±1.4 #	12.6±1.8 #

*: $P<0.01$, *vs* sham-operation group; #: $P<0.01$, *vs* model group

2.4　SS 和 Ach 含量的相关性分析

各组大鼠不同脑区内 SS 和 Ach 含量的直线相关分析, 二者之间呈显著性正相关($r=0.797$, $P<0.05$)。

3　讨论

3.1　血管性痴呆动物模型的评价

血管性痴呆是老年期痴呆的一种重要类型, 建立一个合理的血管性痴呆动物模型对深入研究血管性痴呆是必不可少的。我们应用 Pulsinelli 的 4VO 法[1] 建立血管性痴呆动物模型。这种方法可以高度模拟血管性痴呆的发病特点, 缺血后生理指标稳定, 病理改变明确, 大鼠的存活率较高, 有利于长期观察研究, 是一项较为成熟的血管性痴呆动物模型。本实验大鼠穿梭箱实验 AAR 比率的变化提示模型组大鼠发生学习记忆障碍, 且模型稳定, 重复性好, 证实了该动物模型的可靠。

3.2　血管性痴呆大鼠脑内 SS 和 Ach 含量变化

SS 为一环状 14 肽, 1973 年 Brazeau 首先从羊的下丘脑提取液中分离出来, 并证明其具有抑制生长激素释放的作用。其后的研究表明, SS 在神经内分泌平衡中起复杂的调节作用, 并与学习记忆活动有关[2]。哺乳动物的大脑皮层、海马、下丘脑中都含有丰富的 SS, 大部分 SS 受体分布在神经细胞的突触结构中。研究发现痴呆者大脑皮层、基底节和边缘系统中 SS 含量降低。脑室注射 SS 可显著抑制大鼠在穿梭箱中主动逃

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

避反应的消退;进行空间学习训练过的大鼠大脑皮层SS免疫反应物提高;原位杂交观察到老年大鼠额叶、颞叶皮层的SS前体mRNA水平较年轻鼠明显降低。以上研究均提示SS在学习记忆过程中发挥着重要作用[3~5]。我们的研究结果表明,血管性痴呆大鼠额叶皮层、颞叶皮层、海马、丘脑、纹状体内SS含量显著降低,大鼠穿梭箱实验的AAR比率明显下降。证实SS含量降低与大鼠的学习记忆功能减退有密切关系,提示SS参与了血管性痴呆的病理过程。这与以往的文献报道相一致。

SS在血管性痴呆发病机制中的作用尚不清楚,有研究者提出SS可能通过对多种神经递质的调节以及相互作用参与痴呆的发病。本实验选择Ach进行同步监测,是因为Ach是一种与学习记忆有关的神经递质。老年性痴呆患者脑中的胆碱能神经元丧失,Ach合成显著减少,且与痴呆的严重程度密切相关[6]。本实验也表明血管性痴呆大鼠各个脑区中的Ach含量明显下降,应用胆碱酯酶抑制剂石杉碱甲干预后,其Ach含量明显回升,同时AAR比率得以改善,进一步证实了Ach在血管性痴呆病理过程中的重要作用。

3.3 SS在血管性痴呆中的可能机制

SS是近年来发现的一种新的与痴呆有关的神经递质,但其具体的作用机制尚未明确。一些研究者认为,SS对学习记忆的作用不是孤立的,而是与一些神经递质相互影响[7,8],Ach可能就是其中的一个重要神经递质。本实验表明血管性痴呆大鼠脑内SS和Ach含量均呈现明显降低,直线相关分析发现二者之间呈显著性正相关,提示二者共同参与血管性痴呆的病理过程。为进一步证实这一研究结果,本实验应用胆碱酯酶抑制剂石杉碱甲进行干预,结果显示在血管性痴呆大鼠脑内Ach含量得以提高的同时,相应脑区的SS含量也呈现显著性升高,且二者之间仍然呈显著性正相关。综合本实验的研究结果,大鼠发生血管性痴呆时,行为学上表现为AAR比率的降低,神经生物学上则出现了SS和Ach的同步降低;在应用干预手段提高痴呆大鼠脑内Ach含量以后,大鼠除行为学发生明显改善以外,其脑内SS含量也相应回升,且这两种神经递质之间存在显著的相关性。这些结果有力的提示SS和Ach可能通过相互调节作用,共同参与了血管性痴呆的发病。当然与SS相互作用的神经递质可能不止Ach一种,且作用环节可能较为复杂,确切的结论尚有待进一步深入的研究探索。

参考文献:

[1] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanaesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(3): 267—272.

[2] Reinikainen K J, Riekkinen P J, Jokkonen J, *et al*. Decreased somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex and cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 1987, 402(1): 103—108.

[3] Nilsson L, Mohammed A K, Henriksson B G, *et al*. Influence of place learning on somatostatin levels in the rat brain following environmental deprivation[J]. Regul Pept, 1995, 58(1—2): 11—18.

[4] Van Uden E, Veinbergs I, Mallory M, *et al*. A novel role for receptor-associated protein in somatostatin modulation: implications for Alzheimer's disease[J]. Neuroscience, 1999, 88(3): 687—700.

[5] Grouselle D, Winsky-Sommerer R, David J P, *et al*. Loss of somatostatin-like immunoreactivity in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying the apolipoprotein epsilon 4 allele[J]. Neurosci Lett, 1998, 255(1): 21—24.

[6] Corey-Bloom J, Tiraboschi P, Hansen L A, *et al*. E4 allele dosage does not predict cholinergic activity or synapse loss in Alzheimer's disease[J]. Neurology, 2000, 54(2): 403—406.

[7] Yamazaki M, Matsuoka N, Maeda N, *et al*. FK960 N-(4-acetyl-1-piperazinyl)-P-fluorobenzamide monohydrate ameliorates the memory dedicits in rats through a novel mechanism of action[J]. J Pharmaco Exp Ther, 1996, 279(3): 1157—1173.

[8] Ishida N, Akaike M, Tsutsumi S, *et al*. Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and learning impairment[J]. Neuroscience, 1997, 81(4): 1183—1191.

(编辑 郭建秀)

《生物医学中英文论文写作与编辑》简介

由王正国院士作序,宋双明、冷怀明教授等编著的《生物医学中英文论文写作与编辑》一书于2004年2月由北京大学医学出版社出版发行。该书内容主要包括:中、英文医学论文写作;生物医学英文写作的语法基础与实例分析;生物医学文献检索与数据库的利用;量和单位的标准化使用;医学科研设计与数据的统计学处理;如何向国外杂志投稿,英文投稿信与退修信的书写等。该书的作者均为多年从事中英文医学期刊的编辑或相关专业的教授。书中所列举的例子多从文稿中来,具有代表性、普遍性、实用性。本书有助于读者系统掌握生物医学中英文写作与编辑知识,指导、帮助读者撰写、审修稿件,是您案头写作时有用的一本参考书。全书大32开,340余页,30余万字。定价:22.8元(加邮资共计25元)。需要者,请通过邮局汇款。

地 址:重庆市沙坪坝高滩岩第三军医大学学报编辑部 邮 编:400038

电 话:(023)68753851 传 真:(023)68753851

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net