DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.005
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)03-0193-04

论著

长期注射叠氮钠对大鼠学习记忆和海马内褪黑素受体表达的作用

徐海伟[1],黎海蒂[1],范晓棠[2],吴 旋[1],曹 娟[1],唐 军[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室;[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察长期皮下注射叠氮钠所致的AD大鼠氧化应激模型学习记忆和海马内褪黑素受体表达的变化。方法 采用Morris水迷宫检测大鼠的学习记忆。原位杂交技术检测大鼠海马内褪黑素受体Mel 1a和Mel 1b的表达。结果 皮下间断注射NaN_3后1~4周,大鼠Morris水迷宫测试潜伏期延长,以注射叠氮钠4周组大鼠的潜伏期升高最为明显。大鼠海马Mel 1a受体表达在注射叠氮钠后1周上调,在2周和3周组仍过度表达,在4周组达峰值。而Mel 1b受体表达无明显变化。结论 大鼠长期皮下注射叠氮钠导致学习记忆障碍,可作为AD模型。AD大鼠海马内褪黑素受体Mel 1a的过表达可能是对MT水平下降和氧化应激的代偿反应。

关键词:褪黑素;学习记忆;海马;阿尔茨海默病;原位杂交
中图法分类号:R338.64;R392.2;R741.02;R977.3 文献标识码:A

Effects of sodium azide injected chronically on the learning and memory and the expression of melatonin receptors in the hippocampus of rats

XU Hai-wei, LI Hai-di, FAN Xiao-tang, WU Xuan, CAO Juan, TANG Jun (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of sodium azide injected chronically on the learning and memory and the expression of melatonin receptors in the hippocampus of Alzheimer disease oxidative stress rats. Methods The learning and memory of rats were tested by Morris water maze. The expressions of melatonin receptors Mel 1a and Mel 1b were detected by *in situ* hybridization. Results The escape latency of the rats increased significantly after chronically subcutaneousy injection of sodium azide and significantly increase was found in group of 4 weeks of injection. The melatonin receptor Mel 1a was overexpressed 1 week after injection of sodium azide, remaining at high level 2 and 3 weeks later and peaking 4 weeks later. No significant change of the expression of Mel 1b was found. Conclusion Learning and memory retention disorders of the rats due to chronically subcutaneous injection of sodium azide can be used as AD model. The overexpression of Mel 1a melatonin receptor in the hippocampus of AD rats may probably be the compensation response to the decrease of melatonin level and oxidative stress.

Key words: melatonin; learning and memory; hippocampus; Alzheimer disease; *in situ* hybridization

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)在病程中后期会出现氧化应激,此时脑内过多的自由基超过了线粒体的清除功能,除了对DNA、蛋白质和脂肪造成氧化损伤外,对线粒体也会损伤。AD病人尸检显示,脑内线粒体的细胞色素氧化酶活性和mRNA水平都明显下降,从而使线粒体不能还原体内绝大多数的氧自由基[1]。Bennett等[2,3]采用长期皮下注射叠氮钠(Sodium azide, NaN_3)模拟AD中后期的氧化应激,模型大鼠可出现明显的空间和非空间学习记忆障碍,海马脑片LTP也受到明显抑制。

褪黑素(Melatonin, MT)与AD的关系在近来受到广泛的注意。MT的缺失可以解释AD病人海马去甲肾上腺素、5-HT的降低及单胺氧化酶活性的增加[4]。AD病人脑脊液中的MT浓度为同龄对照组的1/5[5],提示MT水平的下降是AD的一个重要病因。褪黑素的作用是通过其受体发挥的,老化时下丘脑、视交叉上核、脑桥等处的MT受体表达明显减少[6],但在海马中的变化未提及。本研究采用长期皮下注射叠氮钠,复

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900169、30100087);全军"十五"青年基金资助项目(01Q099);重庆市应用基础基金资助项目(2001)
作者简介:徐海伟(1972—),男,江苏省江阴市人,博士,讲师,主要从事褪黑素的神经保护作用及机制方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752254
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-05

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

制AD大鼠模型，并对其进行行为学测试，同时观察海马内MT受体Mel 1a和Mel 1b的时空变化，以求阐明中枢神经系统氧化应激时，作为重要的防御机制的褪黑素受体的表达情况。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Mel 1a pSP72质粒，Mel 1b pSP72质粒：均为香港中文大学医学院生理系S. F. Pang教授惠赠。*Hind* Ⅲ，*Kpn* Ⅰ限制性内切酶，华美公司产品；叠氮钠，Sigma；地高辛标记试剂盒，地高辛抗体均为德国BM产品。显色剂NBT/BCIP，博士德产品。

1.2 AD大鼠模型制备

Wistar大鼠48只（本校实验动物中心提供），雌雄不拘，体重190～215 g，皮下注射NaN_3，按Bennett等[5]方法稍加改动，3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot (2\ h)^{-1}$皮下间断注射$NaN_3$，8次/d，连续注射，分别在注射后1、2、3、4周进行观察。以同等剂量的生理盐水代替NaN_3作为对照组。

1.3 Morris水迷宫检测

Morris水迷宫由直径94 cm，高55 cm圆形水池及站台构成，站台高38 cm，面积为6 cm×10 cm，池内放入水至液面高出站台2 cm，并在水中加入墨水至不能见到站台为止。圆池位于光线良好的实验室内，水温维持在（25±0.5）℃。

行为训练程序包括：①学习组：大鼠共接受训练36次，每天6次，每次间隔15 min，共6 d。入池位置在除站台以外的其他三个象限头朝池壁位置入水，每一次入水位置是假性随机的。②记忆组：训练方法与学习组相同，训练结束后1周开始检测性训练，共3天半，每天6次，无站台转换。从入水到找到站台时间（以秒计）作为逃逸潜伏期（Escape latency）。

1.4 Mel 1a，Mel 1b探针的制备及原位杂交

1.4.1 地高辛标记的Mel 1a，Mel 1b探针的制备 质粒经转化、扩增（宿主菌HB101），*Hind* Ⅲ和*Kpn* Ⅰ双酶切后分别释放出264 bp的Mel 1a和242 bp的Mel 1b cDNA，低熔点胶回收后地高辛随机引物标记试剂盒标记。

1.4.2 原位杂交 大鼠经4%多聚甲醛固定，取脑和脊髓置于4%多聚甲醛/30%蔗糖中后固定及脱水，冰冻切片，片厚35 μm。Mel 1a或Mel 1b原位杂交参照Busuttil等[7]方法，组织切片漂洗、消化后在2 μl/100 μl杂交液中43℃反应20 h（探针100 ℃水浴10 min后，－20 ℃快速冷却），梯度SSC漂洗后，将切片挑入1∶1 000的地高辛抗体4℃过夜，漂洗后，NBT/BCIP显色，脱水封片。

1.4.3 阴性对照 ①以空白杂交液替代含地高辛标记探针的杂交液进行反应；②以抗体稀释液代替高辛抗体进行反应。

1.5 统计学处理

采用医用统计软件SPSS（Ver 10.0）中的t检验和χ^2检验。

2 结果

2.1 注射叠氮钠后大鼠的空间记忆功能改变

皮下间断注射NaN_3后1～4周，采用Morris水迷宫对大鼠进行空间学习和记忆能力检测，共检测12次，和生理盐水对照组相比，大鼠潜伏期延长，由对照组的10 s以下升高到40 s至2 min，见图1，以注射叠氮钠4周组大鼠的潜伏期升高最为明显，较正常对照组升高了974.75%（$P<0.01$）。

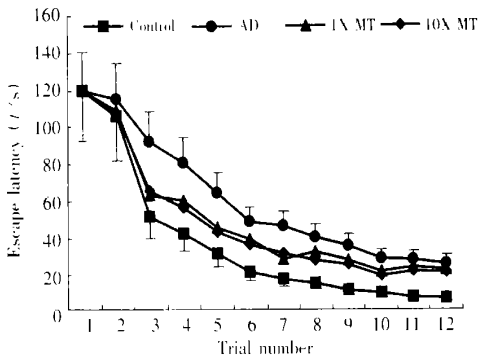


图1 注射叠氮钠后大鼠Morris水迷宫测试逃逸潜伏期变化

Fig 1 Changes of escape latency of rats in the Morris water maze test after injection of sodium azide

2.2 AD大鼠模型各脑区Mel 1a和Mel 1b受体表达的变化

正常大鼠海马各区均有Mel 1a表达，阳性细胞主要位于锥体细胞层，见图2A、B。注射NaN_3 1周组大鼠海马Mel 1a受体表达上调，见图2C，较正常对照组高83.33%（$P<0.05$），在2周和3周组仍过度表达，见图2D、E，分别较对照组高255.56%（$P<0.01$）和447.22%（$P<0.01$），在4周组达峰值，见图2F，较对照组高641.67%（$P<0.01$）。而Mel 1b受体表达无明显变化，见表1。

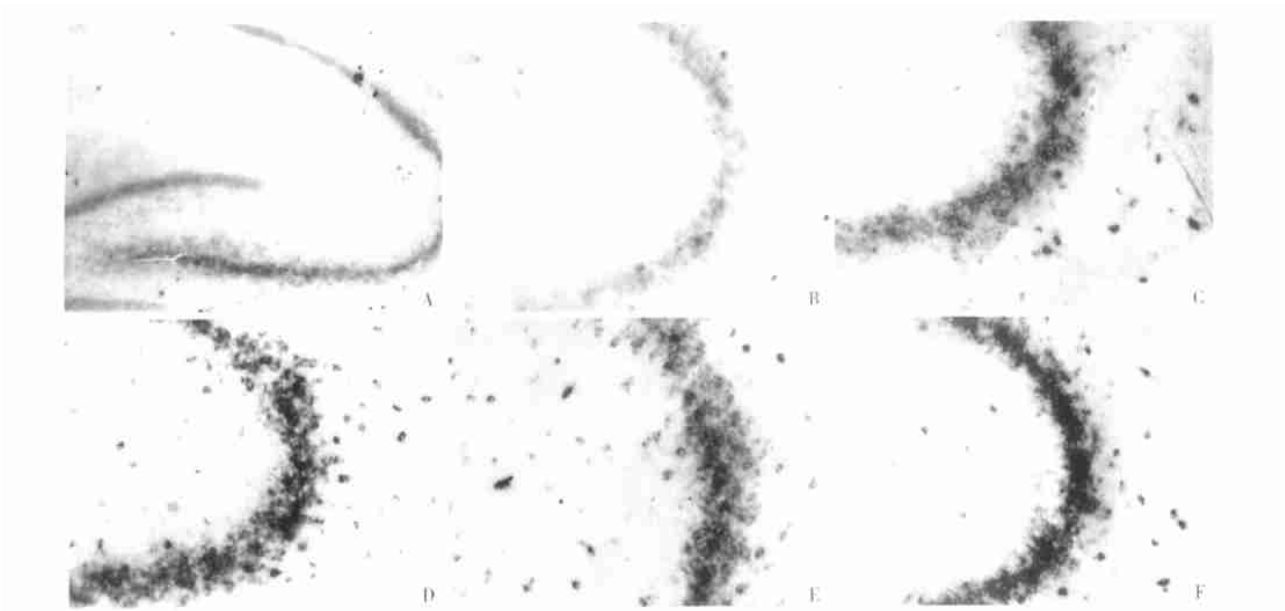
表1 注射叠氮钠后大鼠海马CA3区褪黑素受体mRNA阳性细胞的表化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1 Changes of melatonin receptor mRNA-postive neurons in the CA3 of the hippocampus of rats after injection of sodium azide（$\bar{x} \pm s$）

	n	Mel 1a mRNA-postive neurons	Mel 1b mRNA-postive neurons
Control	24	36±5.5	78±14.4
Postinjection 1w	6	76±12.3 *	89±17.6
2w	6	128±19.3 **	98±12.5
3w	6	197±21.3 **	109±17.6
4w	6	267±28.2 **	121±13.8

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* Control

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



A: Expression of Mel 1a in the hippocampus of rats treated with normal saline(× 50); B: Expression of Mel 1a in CA3 of the hippocampus of rats treated with normal saline(× 200); C: Overexpression of Mel 1a in CA3 of the hippocampus 1 week after injection sodium azide(× 200); D: Expression of Mel 1a in CA3 of the hippocampus was increased 2 weeks after injection of sodium azide(× 200); E: Expression of Mel 1a in CA3 of the hippocampus was increased 3 weeks after injection sodium azide(× 200); F: Expression of Mel 1a in CA3 of the hippocampus reached peak point 4 weeks after injection sodium azide(× 200)

图 2　注射叠氮钠后大鼠海马褪黑素受体 **Mel 1a** 的表达　(NBT/BCIP 染色)

Fig 2　The expression of Mel 1a melatonin receptor in the hippocampus of rats after injection of sodium azide　(NBT/BCIP stained)

3　讨论

AD 是痴呆最常见的原因, 其病因和发病机制一直是研究的热点。目前认为 AD 的病因主要有以下几个方面: ①基因突变, 这种类型所致的 AD 往往是早发性和家族遗传性的。②内分泌改变, 实验显示雌激素水平下降更易出现认知功能下降和神经元变性[8]。近来褪黑素在 AD 发病中的作用也开始受到重视, Poeggeler 等[9] 发现, 通过注射 MT 或给予 MT 合成激动剂 Mg^{2+}, 可以延缓大鼠衰老及家兔老年性疾病发病时间。③慢性炎症, 有证据显示慢性炎症反应和免疫异常参与 AD 的发病过程[10]。尽管 AD 的病因多种多样, 但 AD 的中后期都会出现氧化应激, 对线粒体的结构和功能造成损伤。线粒体功能障碍可导致 AD 病人神经元发生变性[11]。叠氮钠为线粒体细胞色素氧化酶的特异性阻断剂, 长期使用叠氮钠不仅可以阻断线粒体还原体内的氧自由基, 而且可以造成线粒体结构的破坏, 造成线粒体肿胀、嵴断裂, 从而损害机体对氧化应激的防御功能, 造成自由基的堆积, 最终加速脑的老化。褪黑素作为松果体分泌的惟一激素, 可通过血脑屏障, 其强大的自由基清除能力和抗氧化作用近来受到广泛重视, 可对抗因 AD 或脑老化而出现的氧化应激, 补充褪黑素可翻转因年老而引起的认知功能障碍[4]。

本实验显示海马 CA_3 区的 Mel 1a 受体在注射 NaN_3 1 周后表达上调, 在 2 周和 3 周组仍过度表达, 在 4 周组达峰值, 而 Mel 1b 受体表达无明显变化。海马作为与学习记忆密切相关的脑区, 其 Mel 1a 受体在氧化应激时表达上调, 可能是机体对体内 MT 水平下降和氧化应激的一种代偿反应。Benloucif 等[12] 发现, 随着年龄的增加, 下丘脑、视交叉上核、脑桥等处的 MT 受体表达明显减少, 海马中的 MT 受体变化未提及。本实验结果之所以和 Benloucif 不同, 可能是由于老化过程和长期注射 NaN_3 模拟 AD 是两个不同的病理生理过程, 老化时体内各代谢过程都处于衰退状态, 包括 MT 受体的表达, 而注射 NaN_3 模拟 AD 时虽然某些病理过程类似老化, 但机体对氧化损伤的防御机制尚未完全破坏, 还有可能发生某些代偿反应。值得注意的是, CNS 褪黑素及其受体 mRNA 的表达有显著的昼夜节律, 用半定量 RT-PCR 发现在视交叉上核(SCN)中 Mel 1a mRNA 有较大的昼夜波动范围[13], 由于本实验取材时间都固定在 13: 00, 基本可排除昼夜节律性波动的影响。

参考文献:

[1] Hiura T S, Li N, Kaplan R, *et al*. The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles[J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2703－2711.

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

[2] Bennett M C, Diamond D M, Stryker S L, *et al*. Cytochrome oxidase inhibition: a novel animal model of Alzheimer's disease[J]. J Geriatr Psychiatry Neurol, 1992, 5(2): 93—101.
[3] Bennett M C, Rose G M. Chronic sodium azide treatment impairs learning of the Morris water maze task[J]. Behavioral Neural Biology, 1992, 58(1): 72—75.
[4] Raghavendra V, Kulkarni S K. Possible antioxidant mechanism in melatonin reversal of aging and chronic ethanol-induced amnesia in plus-maze and passive avoidance memory tasks[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30(6): 595—602.
[5] Liu C, Weaver D R, Jin X, *et al*. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock[J]. Neuron, 1997, 19(1): 91—102.
[6] Benloucif S, Masana M I, Dubocovich M L. Responsiveness to melatonin and its receptor expression in the aging circadian clock of mice[J]. Am J Physiol, 1997, 273(6 Pt 2): 1855—1860.
[7] Busuttil B, Frauman A. Extrathyroidal manifestations of Graves' disease: the thyrotropin receptor is expressed in extraocular, but not cardiac, muscle tissues[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(5): 2315—2319.
[8] Simpkins J W, Singh M. The potential role for estrogen replacement therapy in the treatment of cogenitive decline and neurodegeneration associated with Alzheimer disease[J]. Neurobiol Aging, 1994, 15(s2): 195—197.
[9] Poeggeler B, Reiter R J, Tan D X, *et al*. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis[J]. J Pineal Res, 1993, 14(4): 151—168.
[10] Meceer P L, Rogers L. Anti-inflammatory drugs and Alzheimer's Disease[J]. Lacent, 1990, 335(11): 1037—1041.
[11] Hiura T S, Li N, Kaplan R, *et al*. The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles[J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2703—2711.
[12] Benloucif S, Masana M I, Dubocovich M L. Responsiveness to melatonin and its receptor expression in the aging circadian clock of mice[J]. Am J Physiol, 1997, 273(6 Pt 2): R1855—1860.
[13] Neu J M, Niles L P. A marked diurnal rhythm of melatonin ML1A receptor mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997, 49(1-2): 303—306.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)01-0196-01

免疫抑制比浊法检测糖化血红蛋白及其临床应用

HbA1c determination of the turbidimetric inhibition immunoassay and its clinical application

吴杰红，邵丽丽 （第三军医大学附属新桥医院检验科，重庆 400037）

糖尿病是一种代谢紊乱性疾病，以持续高血糖、甚至出现糖尿为特征。糖化血红蛋白(HbA1c)可反映测定前8～12周血糖的平均水平，可作为糖尿病长期控制的良好指标。测定糖化血红蛋白方法有离子交换层析法、亲和层析法、电泳法和比色法等。但因各种实验限制不适于大量的常规检测。用免疫抑制比浊法测定糖化血红蛋白，方法特异，用血量少，快速省时的优点，便于临床应用。现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料

正常对照组81例，均为排除糖尿病和糖耐量减退的健康成人，男33例，女48例，年龄18～57岁，平均年龄38.5岁。糖尿病患者组77例，临床已确诊的糖尿病患者，男34例，女43例，年龄18～58岁，平均年龄48.6岁。

1.2 仪器

日立7150全自动生化分析仪，瑞士罗氏公司提供的HbA1c试剂盒。

1.3 方法

HbA1c与抗HbA1c抗体反应形成抗原抗体复合物，再加入载有数个HbA1c抗原决定簇的多簇半抗原，该分子与第一步反应中的过剩抗体反应形成不溶性免疫复合物，于340 nm测量其浊度，用生理盐水和试剂提供的4种浓度的标准液5点效标，仪器检测后自动回归计算。同时测血红蛋白(Hb)的浓度。

计算：HbA1c = HbA1c(g/L)× 100/Hb(g/L)

2 结果

糖尿病患者组的HbA1c含量比较为(9.3±2.2)%，明显高于对照组的(3.9±0.9)%($P<0.01$)。

3 讨论

成人红细胞的血红蛋白主要是HbA1，占90%以上。在红细胞的生存期内，血红蛋白β链的N末端氨基酸的氨基与血中的己糖(主要为葡萄糖)经缓慢，连续非酶促反应生成的产物，为HbA1合成后化学修饰的产物，即糖化血红蛋白(HbA1c)[1]。HbA1c的含量不能反映近期的血糖水平，不能提供治疗的近期效果，可反映测定前8～12周血糖的平均水平，在估计治疗效果，监测病人对治疗的适应性方面是一个很好的参数，是糖尿

（下转200页）

作者简介：吴杰红(1967—)，男，四川省宜宾市人，主管技师，主要从事临床生化方面的研究。电话：(023)68755000-74702

收稿日期：2001-10-25；修回日期：2002-01-29

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