DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.015
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
1408 2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)12-1408-03

血管性痴呆大鼠认知障碍的NMDAR机制研究

姚国恩,王景周,陈曼娥 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 观察四血管阻断(4VO)大鼠海马NMDA受体NMDAR的变化规律,探讨其在血管性痴呆(VD)形成中的作用机制。方法 改良的Pulsinelli 4VO法建立大鼠血管性痴呆模型;电脑控制的穿梭箱系统和离体海马脑片诱导的CA1区LTP检测大鼠学习记忆;原位杂交方法检测大鼠海马NMDAR1 mRNA的表达。结果 VD组大鼠的主动回避反应在2周时较对照组显著下降($P<0.05$),4周和2月时更加明显($P<0.01$),海马脑片长时程增强(LTP)的诱导出现明显障碍;VD组2周时CA1和CA3区NMDAR1 mRNA表达较对照组增高,DG区无明显改变;4周和2月时海马各区表达均减低。结论 大鼠海马区NMDAR与学习记忆有关,在脑缺血的早期表达增高介导了兴奋毒性作用;但在缺血后期,NMDAR mRNA表达减低可能与学习记忆损害有关,为进一步进行NMDAR拮抗剂和激动剂治疗VD的研究提供了实验依据。

关键词:血管性痴呆;认知;NMDAR;LTP
中图法分类号:R749.1+6;R338;R741 文献标识码:A

Relationship between hippocampal NMDA receptor and cognitive impairment of vascular dementia rat model

YAO Guo-en, WANG Jing-zhou, CHEN Man-e (Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To establish a reliable vascular dementia(VD) rat model to study the changes of the NMDAR1mRNA expression in rat's Hippocampus, so as to provide the theoretical basis for the mechanism of NMDAR's effect on cognitive impairment of VD rat model. **Methods** The VD rat model was established by four-vessel occlusion(4VO). The changes of memory ability, LTP and the NMDAR1 mRNA expression in the hippocampus were administered by computerized shuttle-training case, extracorporeal hippocampal slices method and in situ hybridization. **Results** Compared with the control group, the AAR in the VD model group was less in the 2nd week, the 4th week and the 2nd month($P<0.05$). It was more obviously at the later two time points($P<0.01$). In the slices of extracorporeal hippocampal CA1 region, LTP detection showed that its injury had happened clearly in VD model group at each time point of the 2nd week, the 4th week and the 2nd month. Compared with the control group, at the 2nd week the mean optical density (OD) of NMDAR1mRNA expression in pyramidal cell layer of hippocampus in the VD model group was increased in the CA1 and CA3 regions, but no changes were found in DG region; at the 4th week and the 2nd month, it was decreased in each region. **Conclusions** The hippocampal NMDA receptor is related to the cognitive impairment of VD rat model. In the early phase of the brain ischemic-reperfusion injury, the expression of NMDAR mRNA increase, which mediate the exitotoxicity, but it decrease in the anaphase, which might be correlated to the learning and memory impairment of VD. Therefore it supply the foundation to use antagonist or agonist of EAAs receptor in the VD therapy.

Key words: vascular dementia; cognition; NMDA receptor; long-term potentiation

在我国,血管性痴呆(Vascular dementia, VD)是老年期痴呆的主要类型之一。但确切发病机制尚不清楚[1]。以谷氨酸受体为代表的兴奋性氨基酸受体,特别是N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)在中枢神经系统具有重要的生理和病理学作用。它既与短时学习记忆的形成密切相关,又可以产生兴奋毒性作用导致神经元丢失[2]。但其在脑缺血恢复期的改变及其与认知障碍关系的研究尚有待研究。本实验对VD模型大鼠海马NMDAR进行了检测,并利用穿梭箱和离体海马脑片长时程增强(Long-term potentiation, LTP)进行了学习记忆检测。初步探讨NMDAR在VD形成中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

老龄Wastar大鼠先进行7 d穿梭箱训练,选主动回避反应(AAR)≥80%的健康大鼠60只随机分为对照组(CO)和VD模型组,每组30只。VD组分3个时相点:2、4周,2月,每时相点大鼠10只。

1.2 模型制作

采用改良的Pulsinelli's四血管阻断(Four-vessel occlusion, 4VO)动物模型[3]。大鼠于术前8~12 h禁食,不禁水。10%水合氯醛(0.5 ml/100 g体重)腹腔麻醉。将大鼠俯卧固定于立体定向仪,行背侧颈正中切口,逐层钝性分离暴露双侧第一颈椎横突翼小孔,用直径0.5 mm的电凝针烧灼双侧翼小孔内的椎动脉,造成永久性闭塞。再将大鼠仰卧固定,行腹侧颈正中切口,钝性分离双侧颈总动脉,以"4"号丝线穿线备用。24 h后乙醚麻醉,用微动脉夹夹闭双侧颈总动脉5 min,间隔1 h后再夹闭5 min,共夹闭3次。局部伤口缝合前,均以庆大霉素处理防止感染。对照组处理步骤同上,但不进行椎动脉烧灼和颈总动脉夹闭。

1.3 穿梭箱检查

于术后2、4周,2月两组大鼠分别进行穿梭箱检查。电脑控制的穿梭箱系统由第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第五研究室研制[4]。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

作者简介:姚国恩(1971-),男,河北省石家庄市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事血管性痴呆方面的研究。电话:(023)68757863
收稿日期:2001-12-15;修回日期:2002-05-10

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

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(给箱底通电流 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。每次试验进行 20 次光、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 response, AAR); 而经电刺激后才能完成穿梭动作称被动回避反应(ER); 不能完成穿梭动作则认为失败(Fail)。本实验中大鼠的学习记忆能力以完成 AAR 的次数与测试总次数(20 次)的比值即 AAR 比率代表。

1.4　LTP 细胞模型检测

采用离体海马脑片进行长时程增强(Long term potentiation, LTP)细胞模型检测。LTP 检测系统由第三军医大学基础医学部生理学教研室提供。穿梭箱检测后迅速将清醒的大鼠每组每时相点各 5 只断头, 取出全脑放入约 4 ℃的人工脑脊液中, 沿大脑正中裂切成左右两半。游离海马, 在脑片切片机上连续切片, 共 6~8 片, 片厚 450~500 μm。将脑片平铺于浴槽尼龙网上孵育。1 h 后开始刺激和记录。在解剖显微镜直视下, 借助微电极推进器将供记录用的玻璃电极插入海马脑片 CA1 区锥体细胞层。将钨丝双极刺激电极置于海马脑片 CA2 或 CA1 区的 Schaffer 侧支处。初始测试刺激(Test stimulation, TS) 5~10 min, 待场兴奋性突触后电位(Field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)稳定后, 调整 TS 强度使 fEPSP 幅值为最大幅值的 70%, 进行条件刺激(Conditioning stimulation, CS), CS 参数为 100 Hz, 1 s。CS 后 10~15 min 再施以相同 TS。顺向刺激诱发的生物电信号, 经阴极跟随器和微电极放大器, 输入到记忆示波器。LTP 变化的测量: 负波波谷至扫描基线之间的幅值与所需时程 t 的比值为 fEPSP 斜率 (mv/ms)[5]。在离体脑片上, 以 CS 前后 fEPSP 斜率变化的百分数(%)超过 20%为诱发 LTP 成功。

1.5　大鼠海马 NMDAR1 mRNA 表达的检测

采用原位杂交方法进行检测, NMDAR1 寡核苷酸探针由武汉博士德公司提供。实验步骤参照试剂盒说明书。每组每时相点大鼠各 5 只。采用 MIG2000 图文分析系统对切片进行半定量图像分析。

1.6　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　穿梭箱检查结果

对照组 AAR 与手术前比较无明显差别($P>0.05$)。VD 模型组 2、4 周, 2 月的 AAR 与对照组比较均有差别($P<0.05$), 4 周、2 月更加明显($P<0.01$); 4 周与 2 周比较则无显著性差别($P>0.05$), 见表 1。

表 1　两组大鼠穿梭箱 AAR 结果(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Results of AAR of rats at different time points in 2 groups(%, $\bar{x}\pm s$)

	n	Pre-operation	Post-operation		
			2 weeks	4 weeks	2 months
CO	30	91.2±5.2	90.0±5.0	91.5±5.5	91.0±6.0
VD	30	91.0±5.2	59.5±4.6**	39.5±8.5**	41.0±8.2**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* CO group

2.2　大鼠离体海马脑片 CA1 区 LTP 的变化

各组间及组内海马脑片 CS 前后潜伏期变化无明显差异。比较 CS 前后 fEPSP 斜率变化的百分率, 见表 2, VD 模型组各时相点与对照组比较均有显著差别($P<0.01$), LTP 几乎诱导不出; 另外, VD 模型组 AAR 与 CS 前后 fEPSP 斜率百分率变化呈正相关($r=0.919$, $P<0.01$)。

表 2　各实验组大鼠脑片 CS 前后 fEPSP 斜率变化(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of the fEPSP slope by CS in each group(%, $\bar{x}\pm s$)

		n	Changes of fEPSP slope
CO		15	84.41±10.43
VD	2 weeks	5	11.66±4.65**
	4 weeks	5	18.57±4.39**
	2 months	5	17.09±2.07**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* CO group

2.3　大鼠海马区 NMDAR1 的表达

光镜观察 NMDAR1 在大鼠海马的分布: 各组均可见 NMDAR1 mRNA 阳性细胞在海马主要分布于海马回锥体细胞层及齿状回颗粒细胞层, 以 CA3 区锥体细胞层的平均光密度为最高, 以齿状回颗粒细胞层最低, 阳性细胞胞浆中出现棕黄色颗粒状物质。RNA 酶 A 预处理切片和无探针的预杂交液杂交切片未见任何特异性着色。VD 模型组大鼠海马锥体细胞层 NMDAR1 mRNA 表达的平均光密度与对照组相比 2 周时 CA1 区、CA3 区分别增加 18.75%和 13.2%, 而在齿状回颗粒细胞层表达无明显变化($P>0.05$); 在 4 周、2 月时 CA1 区降低 6.34%、10.65%, CA3 区降低了 10.67%、17.84%, 见表 3。

表 3　各组大鼠海马各区 NMDAR1 mRNA 表达的光密度($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　OD of the hippocampal NMDAR1 mRNA expression in each group($\bar{x}\pm s$)

		n	CA1	CA2	CA3	DG
CO		15	0.33±0.01	0.33±0.02	0.40±0.01	0.29±0.03
VD	2 weeks	5	0.38±0.05**	0.34±0.03	0.44±0.03*	0.29±0.01
	4 weeks	5	0.31±0.01*	0.33±0.01	0.36±0.03*	0.27±0.02*
	2 months	5	0.30±0.02**	0.33±0.02	0.35±0.02**	0.28±0.05

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* CO group; CA1~CA3: pyramidal cell layer of hippocampal CA1~CA3 region, DG: granular cell layer of gyrus regions

3　讨论

脑血管病是引发 VD 的主要原因, 以缺血性脑血管病居于首位。目前认为反复缺血再灌注和长期慢性脑灌注不足是 VD 的主要原因, 4VO 为国际公认的 VD 造模方法, 它可高度模拟 VD 的发病特点[6]。目前大鼠学习记忆的检查包括行为学检测(水迷宫、穿梭箱等)和细胞模型检测(LTP、长时程抑制)。本实验造型 2 周后即出现明显 AAR 下降, 4 周和 2 月时进一步下降以及海马脑片上 LTP 的诱发明显障碍等, 证实了该模型的可操作性和明确的不可逆的学习记忆损害。

已知 NMDAR 包含 NMDAR1 与 NMDAR2 两个亚基[7], 其中 NMDAR1 是必需功能亚基[8], 而 NMDAR2 对整个受体通道的功能起修饰作用[9]。由于 NMDAR1 的分布可以代表整个 NMDAR 的分布情况, 本实验仅对 NMDAR1 mRNA 的表达进行检测。

脑缺血急性期, EAAs 及其 NMDAR 的兴奋毒性作用已被人们所公认[10], 并认为脑缺血后 NMDAR 活化是导

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

致脑缺血后学习和记忆障碍的一种重要因素[11]。但有研究证实 EAAs 过多释放活化 NMDAR 引起学习和记忆障碍发生于缺血再灌注早期[12]。在脑缺血恢复期和 VD 形成阶段其作用机制尚有待研究。而在阿尔茨海默氏病等变性疾病引起的智能损害中,已证明海马 CA1 区 NMDAR 是减少的,且这些变化与 LTP 的减弱呈正相关[13]。应用适当的 NMDAR 激动剂可以改善智能障碍[14],能明显增加 NMDA 受体的密度,促进突触体 Glu 释放,加强海马脑片上 LTP 的幅度,脑皮层厚度及海马 CA1 区突触数增加,对学习记忆过程有促进作用。

本实验证实,在脑缺血后 2 周,海马 CA1 区 NMDAR mRNA 的表达仍高于对照组,提示 EAAs 及其 NMDAR 的兴奋毒性可能仍然存在,在早期应用 NMDAR 拮抗剂基础上,似可继续使用以避免神经元损伤。但在缺血后 4 周,海马 CA1 区 NMDAR mRNA 的表达低于对照组,至 2 月时这一趋势更加明显。提示 NMDAR 的兴奋毒性作用已不存在,学习记忆的进一步损害可能与 EAAs 及 NMDAR 减少致神经传递功能障碍有关。此时 NMDAR 的作用可能与在阿尔茨海默氏病中类似,能否应用 NMDAR 激动剂[15](如黄皮叶中提取的有效成分黄皮酰胺)以改善智能障碍有必要进一步研究。血管性痴呆后 NMDAR 表达减低的机制,可能与海马缺血、缺氧致神经元死亡或结构受损有关,也可能与神经元长期低代谢影响神经传递有关。但是否与早期 EAAS 过度兴奋致 NMDAR 消耗过多有关也需进一步深入研究。另外,本实验中 NMDAR1 mRNA 的表达与 LTP 损害不能用直线回归方程进行相关分析,亦可以 NMDAR 存在正反两方面的作用解释。

当然,本实验 NMDAR mRNA 的检测只是提供了该受体变化的可能趋势,如若证实,需进一步在蛋白水平上进行 NMDAR 活性的测定。

参考文献:

[1] 贾建军,王鲁宁,汤洪川. 血管性痴呆的发病机制[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2000,2(2):139-142.
[2] Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, *et al*. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain [J]. Science, 1999,283(5 398):70-74.
[3] Schmidt-Kastner R, Paschen W, Ophoff B G, *et al*. A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats[J]. Stroke, 1989,20(7):936-938.
[4] 刘 彦,何庆华,廖维宏,等. 微机控制的穿梭箱双向主动回避反应实验系统[J]. 中国应用生理学杂志,1999,12(4):366-368.
[5] Andersen P, Sundberg S H, Sveen O. Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices[J]. Nature, 1977,266:736-737.
[6] 陈振虎,赖新生,江钢辉. 实验性血管性痴呆大鼠动物模型研究进展[J]. 山西医药杂志,2000,29(5):402-403
[7] Ishiii T, Moriyoshi K, Sugihara H, *et al*. Molecular characterization of the faimly of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits[J]. Biol Chem, 1993,268(4):2 836-2 843.
[8] Gurden H, Takita M, Jay T M. Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses *in vivo*[J]. J Neurosci, 2000,20(22):RC106.
[9] Nakazawa T, Ebina Y, Miki T, *et al*. Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR{epsilon}2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor[J]. J Biol Chem, 2000,611:586-592.
[10] Dalkara T, Ayata C, Demirei M, *et al*. Effects of cerebral Ischemia on N-methyl-D-aspartate and dihydropyridine-sensitive calcium currents[J]. Strok, 1996,27(1):127-133.
[11] Ohno M, Yamamoto T, Ueki S. Effect of the kappa-receptor agonist, U-50,488H, on cerebral ischemia-induced impairment of working memory assessed in rats by a three-panel runway task[J]. Eur J Pharmacol, 1991,193(3):357-361.
[12] Swan J H, Meldrum B S. Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischaemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1990,10(3):343-351.
[13] Greenamyre J T, Young A B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 1989,10(5):593-602.
[14] Wesnes K A, Faleni R A, Hefting N R, *et al*. The cognitive, subjective, and physical effects of a ginkgo biloba/panax ginseng combination in healthy volunteers with neurasthenic complaints[J]. Psychopharmacol Bull, 1997,33(4):677-683.
[15] Kornhuber J, Wiltfang J. The role of glutamate in dementia[J]. J Neural Transm, 1999,106(2):213.

(编辑 冯崇英)

(上接 1407 页)

和肠系膜上动脉的夹角变小,肠系膜上动脉嵌压十二指肠,而发生梗阻症状,其发病率为 1%,本症多发生于伤后 3 周以后,体重下降 10%以上的病人,该患者伤后第 8 天即发病,原因如下:①患者先天性肠系膜上动脉与腹主动脉夹角小(仅为 12°),4 周后 B 超复查夹角无明显改变证实。② 烧伤后早期低蛋白,胃肠道水肿,胶体摄入量不足。③ 烧伤后胃肠道功能下降、胃潴留及急性胃扩张。④原有"胃下垂"。⑤烧伤时正处于哺乳期,休克后一直禁食,长期卧床,超高代谢及负氮平衡致肠系膜及腹膜后脂肪垫减少。因此当大面积烧伤患者,尤其是年轻消瘦女性,烧伤早期出现无痛性腹胀及剧烈呕吐,排除其他腹胀原因,要考虑该病。

护理方面主要是禁食,持续胃肠减压,观察胃液量及性质,如平均每小时小于 30 ml 即可停胃肠减压,逐渐试进餐。延长俯卧时间,俯卧时症状可缓解。加强静脉营养,补足热量,使日热卡量基本达到第三军医大学营养公式要求即[(身高-0.6)×1.5×1000+烧伤面积×25],该病人身高 1.55 m,日热卡量应达到 3 000~3 500 千卡,增加蛋白质摄入,否则,原因未除,极易复发。做好各项生化检查,防电解质紊乱。禁食期间静脉补钾 9 g/d,进食后 6 g/d,并口服果味钾 4 g/d。做好心理护理,消除病人紧张情绪,力求配合治疗。保持床单位清洁,创造一个舒适的休养环境。观察大便次数,排气情况,听诊肠鸣音,有无腹胀及胃型。

关键词:肠系膜上动脉压迫综合征
中图法分类号:R572.3 文献标识码:B

参考文献:

[1] 黎 鳌 主编. 烧伤治疗学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1995. 294-295.

(编辑 张大春)

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