

• 专题研究 •

微泵恒速灌注叠氮钠致痴呆大鼠脑内胆碱及单胺类神经递质含量改变

张兰 张如意 李林* 王蓉 叶翠飞 盛树力

[摘要] 目的 观察线粒体呼吸链复合体 IV(线粒体细胞色素 C 氧化酶)抑制剂叠氮钠对大鼠脑内胆碱及单胺类神经递质的影响,探讨线粒体缺陷导致学习记忆障碍的可能机制。方法 SD 大鼠皮下埋植 Alzet 微泵,连续恒速给予叠氮钠共 30 天,分为 1 mg/kg/h 和 2 mg/kg/h 两个剂量组。取脑,分区测定皮层和海马胆碱乙酰基转移酶(放射化学法)及乙酰胆碱酯酶(羟胺比色法)的活性;高效液相色谱法测定纹状体内单胺类神经递质及其代谢产物含量。结果 模型大鼠皮层和海马胆碱乙酰基转移酶活性降低,海马区乙酰胆碱酯酶活性升高,皮层和海马胆碱乙酰基转移酶与乙酰胆碱酯酶活性的比值明显降低。纹状体内单胺类神经递质及其代谢产物含量各组间无明显差异。结论 线粒体细胞色素 C 氧化酶活性的抑制可以导致动物脑内胆碱乙酰基转移酶及乙酰胆碱酯酶活性的异常,是模型大鼠学习记忆能力障碍的基础。微泵恒速灌注叠氮钠仅损伤大鼠脑内胆碱能神经系统,对脑内单胺类神经递质无影响,可作为拟痴呆模型,应用于发病机理及药理学等方面的研究。

[关键词] 叠氮钠;学习记忆;线粒体;胆碱乙酰基转移酶;乙酰胆碱酯酶;单胺类神经递质;大鼠

Effect of sodium azide infusion by minipump on cholinergic and dopaminergic neurotransmitter in the brain of rats ZHANG Lan, ZHANG Ru-yi, LI Lin, et al. Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China

[Abstract] Objective To observe the influence of mitochondrial cytochrome c oxidase (COX) decrease on cholinergic and dopaminergic system in brain of model rats. Methods Rats were administrated with 1 mg/kg/h or 2 mg/kg/h subcutaneously via an Alzet minipump for 30 days. Choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) activity in hippocampus and cortex of rats were measured by radiochemical method and hydroxylamine colorimetry separately. The contents of Norepinephrine (NE), dopamine, 5-hydroxytryptamine (5-HT) and their metabolic products in striatum were measured by HPLC. Results ChAT activity was significantly inhibited in hippocampus and cortex of model rats, however, the activity of AChE increased in hippocampus and was not affected at the cortex. Therefore, the ratio of ChAT/AChE decreased in model rats. The content of NE, dopamine, 5-HT and their metabolic products in striatum were not different among all groups. Conclusions COX deficiency can induce abnormality of ChAT and AChE activity in model rats. Dysfunction of neurotransmitter acetylcholine would be account for learning memory deficiency. Model rats indicated cholinergic system deficit without any dopaminergic system abnormality, so chronic infusion of sodium azide via minipump may specially serve as a tool for developing the experimental model of Alzheimer's disease.

[Key words] sodium azide; learning memory; mitochondria; choline acetyltransferase; acetylcholinesterase; monoamine; rats

中图分类号: R395.2, R741, R338 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2003)09-0536-04

随着世界人口老龄化,中枢神经系统退行性疾病发病率逐年上升。目前研究发现,线粒体缺陷与多种神经退行性疾病的发生密切相关,其中老年性痴呆患者体内线粒体呼吸链复合体 IV(即细胞色素 C 氧化酶, cytochrome c oxidase, COX) 的异常较为明显及特异^[1]。因此有些学者推测, COX 长期、缓慢的抑制可

能导致动物体内出现阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的病理改变,进而引发学习记忆障碍^[2]。我们以往的研究显示,微泵皮下恒速长期灌注叠氮钠,对大鼠行为学尤其是对学习记忆能力有明显的损伤^[3]。本文对该模型中学习记忆障碍的机制进行了研究,以探讨线粒体呼吸链复合体 IV 缺陷在老年痴呆发病中的意义,及该模型在老年痴呆研究中的作用。

1 材料

1.1 受试动物 SD 大鼠,雄性,3 个月龄,体重(300±22)g,由卫生部药品生物制品检定所提供,合格证:京动管制字 SD 072。

1.2 试剂 叠氮钠(sodium azide, NaN₃)、氯化乙酰胆碱(AchCl)、四苯硼钠、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)、多巴胺(Dopamine, DA)、二羟基苯乙酸(dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole-3-

基金项目:北京市科技新星计划项目(H020821390190);首都医学发展基金项目(No. 2002-3002);北京市自然科学基金项目(No. 7982006);国家重点基础研究发展计划“973”项目(No. G2000057010);首都二四八重大创新工程项目(H010210130113);北京市科委资助北京市重点科技实验室项目(No. 951890600);北京市中医药重点学科项目(2001)。

作者单位:1. 100053 北京市,首都医科大学宣武医院药理研究室(张兰、张如意、李林、叶翠飞);2. 神经生化室(王蓉、盛树力)。作者简介:张兰(1972-),北京市人,在读博士,助理研究员,主要研究方向:中药和神经药理学。通讯作者:*李林。

acetic acid, 5-HIAA)、高香草酸(hormovanillic acid, HVA)、辛烷磺酸钠盐(octyl sulfate sodium salt, OSA)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均为美国 Sigma 公司产品。³HCoA (185 mCi/mmol): Amersham Life Science 公司产品, PPO(2,5-二甲基恶唑) Fluka 公司(进口分装), POPOP(1,4-双(5-苯恶唑基-2)苯) Phillipsburg, NJ 公司产品,三羟甲基氨基甲烷(Tris)、苄胺、高氯酸、碱羟胺溶液、FeCl₃、EDTA 购自北京市化学试剂公司。Folin 酚购自鼎国生物技术公司。

1.3 主要仪器 微泵,美国 Alzet 公司生产,型号: Alzet 2 ML4,容量 2 ml,泵液速度 2.5 μl/h,37℃,等渗条件下可持续恒速泵液 30 天。LP400 型酶标仪为法国 Pasteur 公司产品,高效液相色谱仪为日本 SHIMADZU 公司 LC-10AT 型。

2 实验方法

2.1 模型建立 参照 Bennett 等^[4]的方法,无菌操作。叠氮钠用无菌生理盐水(NS)配制为 120 mg/ml 和 240 mg/ml 两个剂量(相当于 1 mg/kg/h 和 2 mg/kg/h 持续释放 30 天),精确吸取 2 ml 液体注入微泵囊内,将流量调节器缓慢插入囊内,对照组(假手术组)微泵内注入等量无菌生理盐水。于背部中心向右向下各 1 cm 处,与脊柱平行切开皮肤 1 cm,向头侧钝行分离 2—3 cm,放入微泵,微泵释放口朝向鼠头侧放置,缝合皮肤,称重后放回鼠笼,30 天后取脑检测。

2.2 大鼠脑胆碱乙酰基转移酶(choline-acetyltransferase, ChAT)活性测定^[5] 脑组织按 1:20(w/v)匀浆(10 mM EDTA-50 mM PBS 4℃,pH 7.4),每个样品两个管:空白管、结合管,各加入脑匀浆液 50 ml,空白管沸水浴使酶失活;加入反应液各 50 ml(反应液内包括 10 mM 氯化胆碱、1 mM 硫酸毒扁豆碱、10 mM EDTA、300 mM 氯化钠、0.25%白蛋白、50 mM PBS, pH 7.4);各加入非标记乙酰辅酶 A + ³H 辅酶 CoA 20 ml(终浓度 1.35 μmol/L, 0.025 nCi);37℃ 孵育 30 min;10 mM Tris-HCl(pH 7.4,含氯化乙酰胆碱 35.7 mg/L)3.5 ml,4℃ 终止反应;将孵育液移入闪烁杯,每杯加入 2.0 ml 乙腈(含 10 mg 四苯硼钠)和 10 ml 甲苯闪烁液,轻摇 1 min,使生成的 ³H-Ach 提取到甲苯相,静置 10 min 后,于液闪仪测定比活度(DPM)值,结合匀浆液的蛋白浓度计算出 ChAT 活性(nmol/mg/min)。计算公式:

ChAT 活性 = [(样品 DPM-空白液 DPM)/总记数 DPM] × [(每管内(标记物+非标记物)nmol 数)/(mg 蛋白 × 30 min)]

2.3 脑乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性测定^[6] 用 1/15 M 磷酸缓冲液 1:20 匀浆脑组织。样品管内加入脑匀浆 20 μl,1/15 M PB 30 μl,0.014 M AchCl 50 μl,37℃ 温育 30 min(标准管不温育),加入碱

羟胺溶液 200 μl,反应 5 min,加入 2 N HCl 200 μl,FeCl₃ 300 μl,10000 rpm 离心 5 min,取上清 300 μl,酶标仪在波长 492 nm 比色,得 OD 值。非酶管不加脑匀浆,标准管不加脑匀浆也不进行 37℃ 温育,其余步骤同样品管。福林酚法测定每份样品的蛋白含量。计算方法:

AChE 活力(37℃,30 min 水解 Ach μmol/mg 蛋白) = (非酶 OD 值 - 样品 OD 值)/(标准 OD 值/0.7)/mg 蛋白。

2.4 蛋白含量测定 Follin 酚法。

2.5 脑组织单胺类神经递质及其代谢产物含量测定 高效液相色谱法。色谱条件:Waters 公司碳十八反相色谱柱,洗脱液:100 mM 磷酸氢二钠,0.5 mM 乙二胺四乙酸二钠,1 mM octyl sulfate sodium salt,11% 甲醇。调 pH 为 3.85,经过滤脱气后使用,流量 1.0 ml/min。电化学检测器工作电压 0.7 V,测定温度 37℃。标准品在浓度和峰面积间有良好的线性关系, $r > 0.99$ 。

样品预处理:参照张林魁^[7]等方法进行样品的预处理:纹状体组织内加入 0.1 M 高氯酸(每 100 ml 含 L-半胱氨酸 5 mg,内标 DHBA 浓度为 500 ng/ml)0.4 ml,制备匀浆,置高速冷冻离心机 12000 转 4℃ 离心 15 分钟。取上清 10 μl 测定其中的多巴胺及其相关代谢产物的含量。

2.6 统计学处理 使用 SPSS 软件进行分析,数据用均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$),数据采用单因素方差分析。

3 结果

胆碱乙酰基转移酶(ChAT)是合成神经递质乙酰胆碱(Ach)的关键酶,微泵恒速灌注叠氮钠 1 mg/kg/h 持续 30 天,模型动物脑内出现 ChAT 活性的降低,皮层 ChAT 活力与正常对照(假手术)组相比,有显著性差异。2 mg/kg/h 叠氮钠持续灌注 30 天,模型动物脑内 ChAT 活性下降更明显,皮层、海马胆碱乙酰基转移酶活性与假手术组相比显著降低(表 1)。

表 1 大鼠脑皮层、海马胆碱乙酰基转移酶活性(I/mg 蛋白)

分组	n	海马	皮层
假手术组	6	278.60 ± 27.25	176.88 ± 13.41
NaN ₃ (1 mg/kg/h)组	6	242.26 ± 33.88	122.34 ± 8.99 ^a
NaN ₃ (2 mg/kg/h)组	6	206.75 ± 31.72 ^{a,b}	127.07 ± 5.85 ^a

注:a:与假手术组比较, $P < 0.05$; b:与 NaN₃(1 mg/kg/h)组比较, $P < 0.05$ 。

乙酰胆碱酯酶(AChE)是乙酰胆碱(Ach)降解的关键酶,微泵恒速灌注叠氮钠持续 30 天,模型组皮层乙酰胆碱酯酶活性与假手术组相比无显著性差异;海马区乙酰胆碱酯酶活性在 1 mg/kg/h 叠氮钠灌注组的模型动物无明显改变,2 mg/kg/h 叠氮钠灌注组模型动物海马区乙酰胆碱酯酶活性与假手术组相比显著增高

(表 2)。

表 2 大鼠脑皮层 海马乙酰胆碱酯酶活性 (/ mg 蛋白)			
分组	n	海马	皮层
假手术组	6	0.699 ± 0.141	0.846 ± 0.141
NaN ₃ (1 mg/ kg/ h) 组	6	0.745 ± 0.091	0.719 ± 0.086
NaN ₃ (2 mg/ kg/ h) 组	6	1.013 ± 0.070 ^{a, b}	0.801 ± 0.016

注 :a:与假手术组比较, $P < 0.05$; b:与 NaN₃(1 mg/ kg/ h) 组比较, $P < 0.05$ 。

胆碱乙酰基转移酶与乙酰胆碱酯酶活力比值 (ChAT/ AChE) 可间接反映乙酰胆碱的含量。微泵恒速灌注叠氮钠 1 mg/ kg/ h 持续 30 天,模型动物皮层、海马 ChAT/ AChE 即明显降低。2 mg/ kg/ h 叠氮钠持续灌注 30 天,模型动物脑内 ChAT/ AChE 下降更明显(表 3)。

表 4 大鼠脑纹状体单胺类神经递质含量 (ng/ mg 湿组织重)							
分组	n	NE	DOPAC	DA	5- HIAA	HVA	5- HT
假手术组	6	0.69 ± 0.25	0.51 ± 0.41	2.85 ± 1.32	0.29 ± 0.18	0.18 ± 0.13	0.58 ± 0.25
NaN ₃ (1 mg/ kg/ h) 组	6	0.46 ± 0.16	0.55 ± 0.39	3.09 ± 1.24	0.23 ± 0.05	0.21 ± 0.12	0.57 ± 0.08
NaN ₃ (2 mg/ kg/ h) 组	6	1.01 ± 0.52	0.53 ± 0.19	2.17 ± 0.32	0.27 ± 0.15	0.23 ± 0.14	0.59 ± 0.16

4 讨论

有报道,AD 与脑内线粒体氧化磷酸化异常有关,这一观点已得到广泛的认同。其中,线粒体 COX 活性在 AD 患者脑内、血小板和培养的皮肤成纤维细胞中显著下降^[8],编码其 I、II、III 亚基的 mRNAs 在 AD 患者颞叶、海马等脑区的表达显著下降^[9];虽然未发现特异的线粒体基因突变,但线粒体 DNA 的氧化损伤和不同片断的缺失在 AD 患者普遍存在^[10]。因此,COX 的缺陷被认为可能是 AD 原始而特异的改变,通过一系列机制引发脑内病理改变和行为异常。NaN₃ 是线粒体 COX 的特异性抑制剂,有报道,长期、缓慢地给予叠氮钠,可导致动物脑内 COX 活性下降并引发学习记忆障碍^[4]。我们以往的研究也证明,微泵皮下恒速长期灌注叠氮钠,对大鼠行为学,尤其是对学习记忆能力有明显的损伤。然而,线粒体 COX 缺陷导致模型动物学习和记忆障碍的机制尚未阐明。

由于老年性痴呆患者基底前脑胆碱能神经元缺失后神经递质乙酰胆碱的减少,是导致学习记忆功能下降最直接的病理基础,我们首先观察了微泵皮下恒速长期灌注叠氮钠大鼠脑内胆碱能神经元标志酶 ChAT 活性的改变。研究显示,灌注叠氮钠大鼠脑内皮层及海马区 ChAT 活性与正常对照组相比明显下降,这种改变可能是原发的,即线粒体 COX 活性下降导致了该酶合成或代谢的异常;也可能继发于胆碱能神经元缺失,即线粒体缺陷直接导致神经元损伤,ChAT 活性的下降是胆碱能神经元缺失的反映。动物体内乙酰胆碱是由乙酰辅酶 A 和胆碱在 ChAT 的催化下反应生成的,而其水解则是通过脑内胆碱能神经元另一标志酶

表 3 胆碱乙酰基转移酶与乙酰胆碱酯酶活力比值 (ChAT/ AChE)

分组	n	海马	皮层
假手术组	6	398.42 ± 95.99	216.70 ± 40.82
NaN ₃ (1 mg/ kg/ h) 组	6	325.18 ± 27.08 ^a	177.32 ± 22.42 ^a
NaN ₃ (2 mg/ kg/ h) 组	6	204.01 ± 17.88 ^{a, b}	158.71 ± 5.80 ^a

注 :a:与假手术组比较, $P < 0.05$; b:与 NaN₃(1 mg/ kg/ h) 组比较, $P < 0.05$ 。

为观察模型大鼠脑内是否出现非特异性的广泛损伤,我们检测了与运动功能密切相关的纹状体单胺类神经递质。发现:微泵恒速灌注叠氮钠对大鼠纹状体单胺类神经递质无影响,模型组 NE、DA、5-HT 及其代谢产物 DOPAC、5-HIAA、HVA 含量与正常对照组无显著性差异(表 4)。

AChE 的作用,因此乙酰胆碱的含量是由 ChAT 和 AChE 共同调节的,ChAT 与 AChE 活性的比值 (ChAT/ AChE) 可间接反映乙酰胆碱的含量。我们在实验中发现,模型组 ChAT 活性下降的脑区 AChE 的活性未见明显降低,在海马区反而有所升高,模型组 ChAT/ AChE 在皮层及海马区均显著下降,乙酰胆碱含量减少。该模型能反映疾病重要的病理特征。

我们以往的研究发现:微泵皮下恒速长期灌注叠氮钠,对大鼠学习记忆能力有明显的损伤,但不伴有运动功能障碍^[3]。本实验中,微泵恒速灌注叠氮钠特异性损伤胆碱能神经系统,使胆碱能神经递质减少,是造成模型动物学习记忆障碍的基础。叠氮钠对大鼠纹状体单胺类神经递质无影响,可能是模型运动功能正常的重要机制。叠氮钠全身给药,并未造成模型大鼠脑内非特异性的广泛损伤,只特异地损伤脑内胆碱能神经系统,其机制有待进一步探讨。线粒体呼吸链复合体 IV 的缺陷在老年痴呆发病中具有重要意义,微泵恒速皮下灌注叠氮钠大鼠可作为一种拟痴呆模型,应用于发病机理及药理学等方面的研究。

[参考文献]

[1] Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, et al. The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2002, 28 (5): 390 - 396.

[2] Lalonde R, Hoyal CC, Beaudin S. Effect of sodium azide on motor activity, motor coordination, and learning[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1997, 56: 67 - 71.

[3] 张兰, 叶翠飞, 张如意, 等. 微泵恒速灌注叠氮钠对大鼠学习

- 记忆能力的影响[J]. 中国行为医学科学杂志, 2001, 10(1): 1 - 3.
- [4] Bennett MC, Mlady GW, Fleshner M, et al. Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 1330 - 1334.
- [5] Fonnum F. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase[J]. J Neurochem, 1975, 24: 407 - 409.
- [6] 陈勤. 抗衰老研究实验方法[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996. 111 - 113.
- [7] 张林魁, 钮心懿, 徐瑞明, 等. 用高效液相色谱-电化学法同时测定大鼠脑内单胺递质及其主要代谢产物[J]. 药学报, 1987, 22(8): 591 - 596.
- [8] Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, et al. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F(1)F(0)-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2002, 23(3): 371 - 376.
- [9] Chandrasekaran K, Giordano T, Brady DR, et al. Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1994, 24: 336 - 340.
- [10] Lin MT, Simon DK, Ahn CH, et al. High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(2): 133 - 145.
- (收稿日期: 2003-05-14 修回日期: 2003-08-07)