

腹内侧前额叶注射 β 淀粉样多肽对大鼠自发活动的影响

杨玉凤, 邓海峰, 田绍文

(南华大学医学院 生理学教研室, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 检测腹内侧前额叶微注射 β 淀粉样多肽对大鼠自发活动的影响。 **方法** 双侧腹内侧前额叶边缘下皮层区(IL区)微量注射 A β 1-42 作为 A β 组, 微注射溶媒为溶媒组, 27 天后进行自发活动检测, 腹内侧前额叶进行石蜡切片 HE 染色。 **结果** 虽然 HE 染色显示 A β 组 IL 区细胞受损或完全消失, 但 A β 组和溶媒组在大鼠自发活动的总路程、总时间、中间区域活动路程和中间区域活动时间等方面比较, 差异均无显著性。 **结论** 腹内侧前额叶边缘下皮层区微注射 β 淀粉样多肽不影响大鼠本身的自发活动。

关键词: 腹内侧前额叶; β 淀粉样多肽; 自发活动; 大鼠

中图分类号: R338.63 文献标识码: A 文章编号: 2095-1116(2011)03-0250-03

The Injection of β -amyloid into Ventrol Medial Prefrontal Cortex Impacts on Locomotor Activity in Rats

YANG Yu-feng, DENG Hai-feng, TIAN Shao-wen

(Department of Physiology, Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To assess the effects of the injection of β -amyloid into ventrol medial prefrontal cortex on locomotor activity in rats. **Methods** A β 1-42 was injected into infralimbic cortex of ventrol medial prefrontal cortex in A β group, and 6 μ g vehicle was also injected into the identical cortex in control group. The locomotor activity was examined 27 days after the administration. The sections were stained with haematoxylin-eosin (HE). **Results** Compared with vehicle group, though HE-staining showed neuronal loss around the injection site, the A β group had no effect on the locomotor activity. **Conclusion** The injection of β -amyloid into ventrol medial prefrontal cortex had no effect on locomotor activity in rats.

Key words: ventrol medial prefrontal cortex; β -amyloid; locomotor activity; rat

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease AD) 是一种神经退行性疾病, 会引起大脑皮层、海马和杏仁核的萎缩, 尽管其发病机制尚不清楚, 但已有遗传学和生物化学研究表明 β 淀粉样多肽的过量产生和清除障碍是导致脑区萎缩的主要原因^[1], 脑内微注射 β 淀粉样多肽诱发 AD 模型已经成为一种比较常见的 AD 建模方法^[2], 用来研究 AD 所引起的认知功能障碍, 记忆损害和情绪的异常变化。

旷场实验是观察动物自然状态下活动状况的动物模型, 目前广泛用于焦虑、抑郁等精神症状的评价^[3]。焦虑、感情淡漠、行动迟缓等症状在轻度 AD

病人中就会出现^[4], 而腹内侧前额叶是参与焦虑情绪调节的重要脑区^[5], 本研究旨在通过腹内侧前额叶微注射 β 淀粉样多肽诱发 AD 模型, 从而评估特异性脑区萎缩的 AD 大鼠自发活动中所反映的精神状态以及行为的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物为 50 只成年雄性 SD 大鼠 (体重 250 ~ 280 g), 购自南华大学实验动物中心。大鼠单

独饲养于温度(25 ± 2)℃、湿度恒定的环境中,自由取食和饮水。大鼠处于“12 小时明 - 12 小时暗”的周期中,每天早上七点钟开启照明装置。实验开始前,大鼠熟悉饲养环境 1 周;在此期间,实验者每天抚摸每只大鼠 2 ~ 3 min 以使其熟悉实验者以减少应激。实验操作遵照美国国立卫生研究院的《国家实验动物健康与管理条例》进行。大鼠随机分为 Aβ 组和溶媒组,每组 10 只,共两组。

1.2 自发活动箱

自发活动实验箱由上海吉量软件科技有限公司生产,内箱 40 cm × 40 cm × 50 cm,无顶,箱底铺有橡胶垫,且被分成 16 个面积为 10 cm × 10 cm 小格,中央 4 格所占的区域为中央区,边缘的 12 格为外周区。整个装置放置在隔音箱(外箱)中。隔音箱内的风扇提供 65 dB 的背景噪声。内、外箱是由不透明的黑色有机玻璃组成,外箱顶部有 15W 白炽灯泡提供照明。

1.3 药品

Aβ1-42(北京博奥森生物技术有限公司),脑内微注射前,100 μg Aβ1-42 溶于 40 μL 溶媒中,并在 37℃ 恒温箱中孵育 36 h,转变成聚集态 Aβ1-42。

1.4 手术

以 3% 戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔注射麻醉,用脑立体定位仪取平颅头位固定大鼠,参照 Paxinos 和 Watson 的《大鼠脑立体定位图谱》,定位前凶前 2.7 mm,中线旁 0.5 mm,颅骨表面下 5.1 mm 为双侧腹内侧前额叶注射点,用 5 μL 微量注射器 5 min 内缓慢注入 Aβ1-42 或溶媒,每侧 2.4 μL,予以留针 10 min。

1.5 大鼠自发活动检测

大鼠在手术后 27 天进行自发活动的检测。实验时将单只大鼠放于检测箱底板中央,录像 10 min。检测指标包括 10 min 内的水平活动距离(cm)、中央活动距离(cm)、周围活动距离(cm)、总活动时间(s)、中央区活动时间(s)和外周活动时间(s)。

1.6 组织学检测

自发活动检测 1 天后,所有动物戊巴比妥钠深度麻醉(100 mg/kg,腹腔注射)。主动脉灌注生理盐水清洗血液,之后立即进行 10% 的福尔马林灌注固定。取脑后继续放置于 10% 福尔马林溶液中固定 12 h。之后进行石蜡包埋,切片(厚度 3 μm),HE 染色,切片脱蜡至水。浸入苏木素染液 8 ~ 10 min,水洗洗去苏木素。后 1% 盐酸乙醇分化数秒,去除多余苏木素。流水洗 10 min 以上。伊红染色 4 min。脱水透明封片。

1.7 数据分析

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 sigma stat 3.5 软件进行组间 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 两组自发活动测试结果

Aβ 组和溶媒组自发活动测试结果如表 1 所示,*t* 检验结果表明两组间水平活动距离、中央活动距离、周围活动距离、总活动时间、中央区活动时间和外周活动时间差异都没有显著性(*P* > 0.05)。

表 1 Aβ 组和对照组自发活动测试结果

组别	水平活动距离(cm)	中央活动距离(cm)	周围活动距离(cm)	总活动时间(s)	中央区活动时间(s)	周围活动时间(s)
Aβ 组	1 335.78 ± 123.57	104.12 ± 14.07	1 122.00 ± 109.52	321.66 ± 26.73	30.15 ± 4.16	296.20 ± 25.06
溶媒组	1 332.53 ± 138.10	119.61 ± 24.48	1 087.34 ± 124.39	308.84 ± 28.09	39.05 ± 7.25	273.39 ± 24.27

2.2 腹内侧前额叶(VmPFC 区)HE 染色图片

Aβ 组与溶媒组大鼠腹内侧前额叶(VmPFC 区)HE 染色显微照片,放大为 100 倍如图 1、图 2 所示,与溶媒组相比 Aβ 组腹内侧前额叶边缘下皮层区(IL 区)神经元受损,排列紊乱,数目减少。

3 讨论

本研究检测了腹内侧前额叶微注射 Aβ1-42 诱发的 AD 模型大鼠自发活动的变化,结果表明,Aβ 组和溶媒组在大鼠自发活动的总路程,总时间,周围

区域活动路程和周围区域活动时间都没有表现出差异。虽有研究表明轻度 AD 病人的自发性行为活动较正常人有着显著的下降^[6],在临床诊断中 Aβ 的沉积也会早于临床症状发生几年甚至几十年^[7],同时有研究也表明海马微注射 Aβ1-40 对大鼠的本身的自发活动能力没有影响,而直接损坏海马,则会使大鼠的活动量增加^[8],这说明 Aβ 可能是选择性的作用于某种神经元。

大鼠在中间区域的活动距离和活动时间可以用来检测其焦虑样行为的变化^[9],Ying Tong 等^[10] 研究显示促进 Aβ 产生的 COL25 A1 转基因小鼠的自

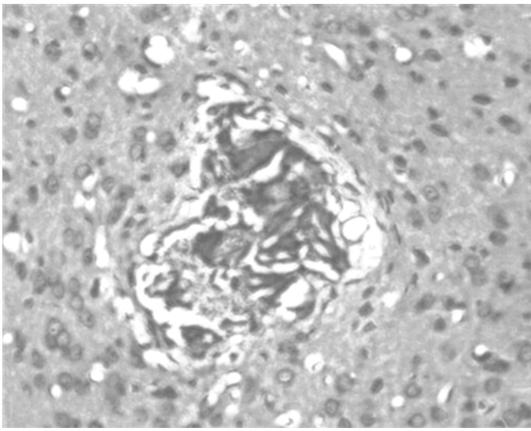


图1 Aβ组大鼠腹内侧前额叶(VmPFC区)显微照片(HE × 100)

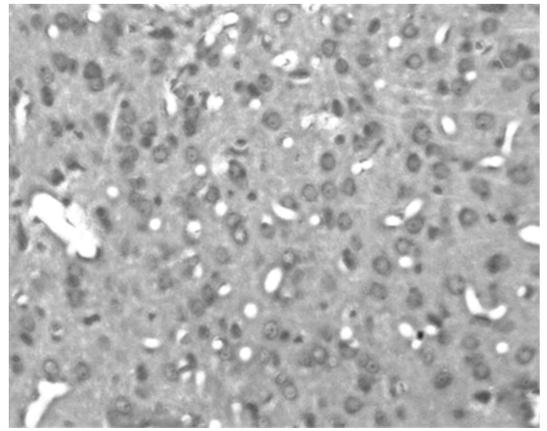


图2 溶媒组大鼠腹内侧前额叶(VmPFC区)显微照片(HE × 100)

发活动减少。但本研究中 Aβ 组和溶媒组未表现有差异,这并不说明腹内侧前额叶微注射 Aβ1-42 对大鼠的焦虑行为没有影响,很可能是自发活动不适用于检测腹内侧前额叶微注射 Aβ1-42 引起的大鼠的焦虑行为。

ANNA KIRYK 等^[11]研究表明谷氨酸载体缺陷纯合体转基因小鼠 GLT1(-/-)较杂合体转基因小鼠 GLT1(+/-)有海马 CA1 区 and 大脑皮层的 II 区有神经元丢失和神经可塑性的显著改变,并且 GLT1(+/-)组小鼠较 GLT1(-/-)组小鼠有较轻的感觉运动损坏,更高的活动度,较低的焦虑,更好的线索性恐惧条件化学习但较差的情境性恐惧条件化学习。从而提示腹内侧前额叶微注射 Aβ1-42 可能是并未损坏此区的谷氨酸载体。

综上所述,虽然 HE 染色显示 Aβ 组 IL 区细胞受损或完全消失,腹内侧前额叶微注射 Aβ1-42 不会影响大鼠的自发活动,因此对阿尔茨海默病引起的行为障碍的机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Mirra SS, Hyman BT. Aging and dementia [A]. Graham DI, Lantos PI Greenfield's Neuropathology. 7th ed [M]. Arnold; New York, 2002. 195-272.

[2] James G McLarnon, Jae K Ryu. Relevance of Aβ1-42 Intrahippocampal injection as an animal model of inflamed alzheimer's disease brain [J]. Current Alzheimer Research, 2008, 5: 475-480.

[3] Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. Physiology Behavior, 2001, 73: 873-886.

[4] Mega MS, Cummings JL, Fiorello T. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease [J]. Neurology, 1996, 46: 130-135.

[5] Anthony BR, Ivan VG, Gregory JQ. Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure [J]. The Journal of Neuroscience, 2009, 29: 8474-8482.

[6] Renaud David, Alice Rivet. Ambulatory actigraphy correlates with apathy in mild Alzheimer's disease [J]. Dementia, 2010, 9: 509-516.

[7] Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease [J]. Ann Neurol, 1999, 45: 358-368.

[8] Nag S, Tang F, Yee BK. Chronic intracerebroventricular exposure to β-amyloid (1-40) impairs object recognition but does not affect spontaneous locomotor activity or sensorimotor gating in the rat [J]. Exp Brain Res, 2001, 136: 93-100.

[9] Russell DR, Astrid M. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation [J]. Hormones and Behavior, 2003, 43: 561-567.

[10] Ying Tong, Ying Xu, Kimberly Scarce-Levie, et al. COL25A1 triggers and promotes Alzheimer's disease-like pathology in vivo [J]. Neurogenetics, 2010, 11: 41-52.

[11] Anna Kiryk, Tomomi Aida, Kohichi Tanaka, et al. Behavioral Characterization of GLT1 (+/-) Mice as a Model of Mild Glutamatergic Hyperfunction [J]. Neurotoxicity Research, 2008, 13(1): 19-30.

(此文编辑 蒋湘莲)