

建立脑内灌流叠氮钠所致的大鼠纹状体细胞外液 乙酰胆碱水平下降的模型

王 巍*, 孙晓芳, 王丹巧, 赵德忠

(中国中医研究院西苑医院老年病研究所, 北京 100091)

摘要: 目的 建立可用于筛选防治老年退行性病变和其他脑细胞损伤所致智能减退药物的模型。方法 应用脑内微透析技术,在清醒自由活动大鼠纹状体内灌流含叠氮钠(NaN_3 , $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和新斯的明($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的林格液,连续收集透析液。用高效液相色谱-柱后固定化酶反应器-电化学检测器检测乙酰胆碱(ACh)和胆碱水平。结果 脑内灌流 NaN_3 90 min 后该脑区细胞外液 ACh 水平较正常组持续下降($P < 0.05 \sim 0.01$)。最低值在停止 NaN_3 灌流后 60 min 时出现,为相同时间点对照组水平的 10.0%;此后有所恢复,但在恢复期 180 min 内未能达到对照组水平。阳性药甲磺酸阿米三嗪($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig, 灌流前连续给药 14 d)可在停止 NaN_3 灌流后 30 和 60 min 时明显减缓 ACh 水平的下降(均 $P < 0.05$)。结论 大鼠脑内灌流 NaN_3 使局部脑区胆碱能神经功能损伤,可造成 ACh 水平持续下降的急性模型。

关键词: 叠氮钠; 微透析; 脑; 乙酰胆碱

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)04-0313-05

近年来,线粒体氧化磷酸化异常与线粒体 DNA 缺陷在老年性痴呆(Alzheimer 病,AD)发病中的作用引起人们的重视。AD 患者脑细胞中与线粒体氧化代谢有关的丙酮酸脱氢酶复合物、 α -酮酸脱氢酶复合物和细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase,

COX)的活性严重降低,其中 COX 活性的降低较为明显且特异^[1]。因此有学者认为 COX 的抑制可能导致培养细胞和动物体内出现类似 AD 的病理改变。叠氮钠(sodium azide, NaN_3)是一种特异性 COX 抑制剂,作为工具药被广泛地应用于药理学研究^[2~7]。已有研究表明它可明显影响胆碱能神经系统的功能^[8]。

本研究拟用 NaN_3 纹状体内灌流造成灌流脑区 COX 抑制,使线粒体功能障碍和细胞受损,进而影响乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)水平,建立细胞外液 ACh 水平下降的急性模型。用于筛选防治老年退行性病变和其他脑细胞损伤所致智能减退的药物。

1 材料和方法

1.1 动物

Sprague-Dawley(SD)大鼠,♂,体重 250~350 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号 SOXK(京)2002-0203。

1.2 试剂和药品

氯化乙酰胆碱(acetylcholine chloride)、氯化胆碱(choline chloride, Ch)、甲基硫酸新斯的明(neostigmine methyl sulfate)均购自 Sigma 公司。 NaN_3 为 Merck 产品。1% Kathon 溶液由 BAS 公司提供。林格(Ringer)液为北京双鹤药业股份有限公司产品,批号:021018712。甲磺酸阿米三嗪/萝巴新片(almitrine bismesylate/raubasine; 又名都可喜, Duxil)为法国 Servier 药厂产品,批号:1G0838,上海福达制药有限公司分装。

1.3 仪器

脑内微透析系统包括 CMA/12 探针(透析膜长 4 mm)及探针套管、CMA/120 清醒动物装置、CMA/102 微量泵、CMA/110 液体开关、CMA/170 低温样品自动收集器及软件均为 CMA 公司产品。

高效液相色谱(HPLC)系统包括 CMA/260 除气

收稿日期: 2003-07-09 接受日期: 2003-09-17

作者简介: 王 巍(1943-),女,浙江省鄞县人,研究员,博士生导师,主要应用微透析和高效液相色谱技术开展老年医学研究;孙晓芳(1978-),女,北京市人,在读硕士,主要从事老年病的基础研究。

* 联系作者 E-mail: wjf43@yahoo.com.cn Tel: (010) 62875599-6410

装置、PM-80 泵、Rheodyne 7125 进样阀、LC-4C 电化学检测器(ED)、ACh 分析柱(3 μm , 100 mm \times 4 mm)及固定化酶反应器(IMER)、白金工作电极、Ag/AgCl 参考电极和色谱工作站均为 BAS 和 CMA 公司产品。

1.4 方法

大鼠随机分 3 组:对照组、模型组和阳性药甲磺酸阿米三嗪组。甲磺酸阿米三嗪组以 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ $\text{ig} \times 14$ d,其余 2 组普通水 $\text{ig} \times 14$ d。2 周后,大鼠 ip 2% 戊巴比妥钠麻醉(40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)后,于纹状体内进行探针套管埋植术(定位坐标 A: +0.2 mm, L: +3 mm, V: 7.5 mm)。术后 24 h 插入探针进行透析。对照组大鼠用含 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 新斯的明的林格液(N-R 液)灌流 450 min;模型组和甲磺酸阿米三嗪组大鼠用 N-R 液灌流 120 min 后,改用含 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaN_3 的 N-R 液灌流 150 min,再恢复 N-R 液灌流 180 min,共计 450 min。灌流速度为 2 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。平衡 60 min 后开始收集透析液,每 30 min 收集 1 管。按照 BAS 公司提供的 ACh/Ch 试剂盒操作手册(MF-9053),用 HPLC-IMER-ED 测定透析液中 ACh 和 Ch 含量。

所有探针在使用前作回收率的测定。实验数据采用两组 t 检验。

1.5 高效液相色谱分析

流动相:每升含 85% 磷酸 3.4 mL,1% Kathon 5

mL,用 NaOH 调 pH 至 8.5。流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。工作电压设为 +500 mV,滤波 0.1 Hz,增益 0.2 μA 。标准曲线用 0.125,0.25,0.5 和 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACh 和 Ch 混合标准液测定。

2 结果

2.1 乙酰胆碱和胆碱的基础水平

本实验中,对照组灌流 240 min 时透析液中 ACh, Ch 的基础水平分别为(0.22 \pm 0.08)和(0.26 \pm 0.02) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n = 5$)。与相似条件下的研究近似^[9]。经探针回收率校正后,所得大鼠纹状体细胞外液中 ACh 和 Ch 的基础水平分别为(1.3 \pm 0.5)和(1.2 \pm 0.1) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n = 5$)。

2.2 叠氮钠灌流对乙酰胆碱水平的影响

表 1 结果可见,模型组大鼠在用 N-R 液灌流的开始 60~120 min 内 ACh, Ch 水平均与对照组无显著差异。加入 NaN_3 灌流后 ACh 水平逐渐下降,在灌流 210 min(NaN_3 灌流 90 min)时较对照组显著下降,灌流 270 min(NaN_3 灌流 150 min)时下降到相同时间点对照组水平的 22.7%。270 min 起恢复 N-R 液灌流,ACh 水平仍继续下降,至 330 min(恢复 N-R 液灌流后 60 min)时达到本次实验的最低值(22.2 \pm 2.5) $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (未经回收率校正),为相同

Tab 1. Effect of striatal perfusion with sodium azide(NaN_3) on striatal extracellular acetylcholine(ACh) and choline(Ch) levels in rat

Time of perfusion/min	ACh/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$			Ch/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		
	Control	Model	%	Control	Model	%
90	395 \pm 239	395 \pm 16	100.0	0.67 \pm 0.13	0.64 \pm 0.29	95.4
120	354 \pm 198	329 \pm 33	93.0	0.49 \pm 0.09	0.46 \pm 0.22	93.5
150	321 \pm 156	288 \pm 25	90.0	0.49 \pm 0.09	0.46 \pm 0.22	95.2
180	297 \pm 156	247 \pm 33	83.3	0.45 \pm 0.07	2.23 \pm 0.36 ^{**}	492
210	272 \pm 94	140 \pm 25 [*]	51.5	0.41 \pm 0.08	3.07 \pm 0.47 ^{**}	752
240	222 \pm 91	70.9 \pm 7.4 ^{**}	31.9	0.36 \pm 0.09	3.44 \pm 0.56 ^{**}	946
270	214 \pm 74	48.6 \pm 4.9 ^{**}	22.7	0.32 \pm 0.06	3.71 \pm 0.59 ^{**}	1168
300	198 \pm 82	33.0 \pm 4.9 ^{**}	16.7	0.28 \pm 0.03	3.96 \pm 0.42 ^{**}	1408
330	222 \pm 107	22.2 \pm 2.5 ^{**}	10.0	0.26 \pm 0.02	3.86 \pm 0.56 ^{**}	1492
360	231 \pm 82	74 \pm 41 ^{**}	32.1	0.24 \pm 0.06	3.02 \pm 0.47 ^{**}	1280
390	214 \pm 66	107 \pm 74 [*]	50.0	0.21 \pm 0.05	2.43 \pm 0.48 ^{**}	1166
420	222 \pm 82	82 \pm 33 ^{**}	37.0	0.20 \pm 0.05	2.17 \pm 0.46 ^{**}	1086
450	222 \pm 91	91 \pm 33 ^{**}	40.7	0.19 \pm 0.06	1.94 \pm 0.45 ^{**}	1020

Control group was perfused with Ringer solution containing 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ neostigmine(N-R solution) for 450 min, 2 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Model group was perfused with N-R solution for 120 min, followed by N-R solution containing NaN_3 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 150 min, and again N-R solution for 180 min. ACh and Ch levels were measured every 30 min from 60 min. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with control group.

时间点对照组水平的 10.0%。之后逐渐恢复,但在 540 min(恢复灌流 180 min)始终低于同期的对照组。

2.3 叠氮钠灌流对胆碱水平的影响

Ch 水平在加入 NaN_3 灌流后显著上升, NaN_3 灌流 60 min(总灌流 180 min)时即达到相同时间点对照组水平的约 5 倍,之后继续增高。在恢复灌流 30 min(总灌流 300 min)时达到本实验的最高值(3.96 ± 0.42) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (未经回收率校正),为对照组的 14 倍。然后 Ch 水平逐渐下降,但在恢复期的 180 min 内未能恢复到对照组水平,始终有显著性差异(表 1)。

2.4 甲磺酸阿米三嗪对叠氮钠灌流大鼠纹状体细胞外液乙酰胆碱水平的影响

甲磺酸阿米三嗪组在停止 NaN_3 灌流 30 和 60 min(总灌流 300 和 330 min)时间点的 ACh 水平较同时时间点的模型组增高(图 1)。表明其能减缓 NaN_3 灌流所致纹状体细胞外液 ACh 水平的下降。

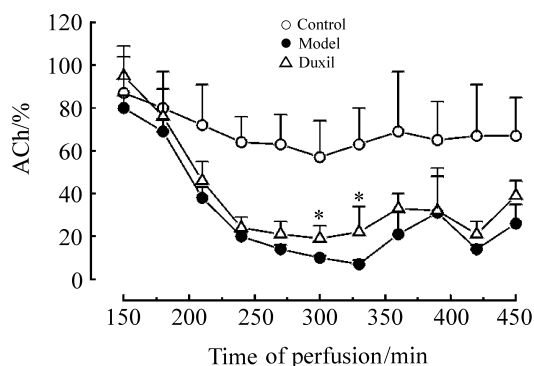


Fig 1. Effect of Duxil on striatal extracellular ACh level during striatal perfusion with NaN_3 in rats. The perfusion protocols are the same as described in Tab 1. Duxil 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was given ig for 14 d before the striatal perfusion. ACh level is represented as the percentage of basal levels before NaN_3 -N-R solution perfusion. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with model group.

3 讨论

ACh 是胆碱能神经传导的内源性神经递质,脑内 ACh 水平的平衡调节对维持学习、记忆、注意力等脑高级功能的正常运作至关重要,ACh 的代谢异常又与 AD、帕金森病等多种神经退行性疾病的认知功能密切相关。通过测定脑内 ACh 的含量可以较可靠的反映脑内胆碱能神经的功能。

HPLC-IMER-ED 检测 ACh, Ch 的方法,和脑内微透析技术相结合,可以动态检测脑内细胞外液中 ACh, Ch 的水平。由于是在体检测,ACh 由神经末

梢释放出后,很快就被脑内乙酰胆碱酯酶(AChE)水解生成 Ch,导致细胞外液中 ACh 的浓度很低而难以测出^[10],所以在灌流液中加入可逆性 AChE 抑制剂新斯的明阻止 ACh 的水解。

有研究表明,药物作用后纹状体内细胞外液 Ch 水平的变化范围很大,这种变化的产生与 Ch 的摄取密切相关^[11]。由此推测 ACh 水平降低的原因可能有:① NaN_3 特异性抑制 COX,导致线粒体能量合成障碍,ATP 产生减少,使 ATP 依赖的 Na^+/K^+ 泵活性下降,神经细胞膜电位异常,致使与膜电位密切相关的 Ch 的摄取大量减少,细胞外液中 Ch 水平增高而神经末梢内用于合成 ACh 的 Ch 减少,进而影响 ACh 的合成。②膜电位异常使 ACh 释放减少。③线粒体能量合成障碍直接影响 ACh 的合成^[12]。

应用 NaN_3 作为工具药进行有关 AD 的研究多见报道。有研究证明较低浓度 NaN_3 可造成培养神经细胞微管结构的改变,细胞及线粒体膜电位异常,硫氧还蛋白 mRNA 表达量的下降和 β 淀粉样蛋白表达水平的增高,进而引起神经细胞存活率的显著下降^[2-5]。 NaN_3 脑内灌流可造成灌流脑区氧自由基的显著升高^[6]。这些神经生化与分子遗传方面的异常与 AD 患者十分相似。并且已有利用微泵恒速皮下灌注 NaN_3 4 周制备 COX 活性抑制动物模型出现明显的学习记忆障碍的报道^[7]。 NaN_3 致线粒体损伤模型可能成为 AD 发病机制以及药物研究的新靶点。

本研究表明,脑内灌流 NaN_3 所致局部脑区 ACh 和 Ch 水平异常的急性模型中,ACh 水平下降较稳定,且持续时间较长,阳性药有一定的减缓 ACh 水平下降的作用。因此该模型可能为防治 AD 的药物研究提供快速筛选的方法。

4 参考文献:

- [1] Wang XD. *Neurology: Neurometamorphic Disease* (神经病学:神经变性性疾病)[M]. Beijing: People's Military Medical Publisher, 2002. 249-320.
- [2] Zhang L, Li L, Liu SS, An WL, Xue B, Ban LQ, et al. Sodium azide induces damage of microtubules and cell viability in cultured nerve cells[J]. *Chin J Neurosci* (中国神经科学杂志), 2000, 16(3):257-262.
- [3] Zhang L, LI L, Ban LQ, An WL, Liu SS, Li XM, et al. Effects of sodium azide on mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 2000, 22(5):436-439.

- [4] Piao JH, Li L, Zhang L, An WL, Xu YL. Effects of sodium azide on the membrane potential and the expression of intracellular (beta)-amyloid in SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. *Chin J Geriatr* (中华老年医学杂志), 2002, **21**(2):127 - 130.
- [5] Qin Y, Gao J, Zhang TT, Zhao L, Wu HW. Changes in thioredoxin mRNA level in neurons insulted by sodium azide [J]. *Acta Biol Exp Sin*(实验生物学报), 2002, **35**(1): 26 - 30.
- [6] Smith TS, Bennett JP Jr. Mitochondrial toxins in models of neurodegenerative diseases. I: *In vivo* brain hydroxyl radical production during systemic MPTP treatment or following microdialysis infusion of methylpyridinium or azide ions[J]. *Brain Res*, 1997, **765**(2):183 - 188.
- [7] Lalonde R, Joyal CC, Beaudin S. Effects of sodium azide on motor activity, motor coordination, and learning [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, **56**(1):67 - 71.
- [8] Fujimura T, Kobayashi H, Suzuki T, Sato I, Hara S. Neurotoxicity in sodium azide poisoning[J]. *Chudoku Kenkyu*, 2002, **15**(3):281 - 288.
- [9] Ye WL, Ma XF, Mei ZT. Determination of acetylcholine and choline in microdialysates from rat brain by high performance liquid chromatography with electrochemical detection combined with a post-column immobilized enzyme reactor [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1998, **16**(5): 375 - 378.
- [10] Flentge F, Venema K, Koch T, Korf J. An enzyme-reactor for electrochemical monitoring of choline and acetylcholine: applications in high-performance liquid chromatography, brain tissue, microdialysis and cerebrospinal fluid[J]. *Anal Biochem*, 1992, **204**(2):305 - 310.
- [11] Ikarashi Y, Takahashi A, Ishimaru H, Arai T, Maruyama Y. Relations between the extracellular concentrations of choline and acetylcholine in rat striatum[J]. *J Neurochem*, 1997, **69**(3):1246 - 1251.
- [12] Tang XC. Acetylcholine[A]. In: Zou G, ed. *Basal Neuropharmacology*(基础神经药理学)[M]. 2nd ed. Beijing: Science Publishing House, 1999. 153 - 166.

The model on decreasing striatal extracellular acetylcholine level by intracerebral perfusion with sodium azide in rats

WANG Wei*, SUN Xiao-Fang, WANG Dan-Qiao, ZHAO De-Zhong

(*Institute of Geriatrics, Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China*)

Abstract: **AIM** To establish a usable method to screen the medicines for preventing and treating neurodegenerative diseases and intellectual deficiency. **METHODS** Male Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups randomly: normal group, model group and Duxil group which was treated with Duxil 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig for 14 d. Utilizing the microdialysis technique to perfuse Ringer solution containing 10 μmol·L⁻¹ neostigmine and NaN₃ 30 mmol·L⁻¹ into striatum of freely moving awake rats, and continuously collect the microdialysate sample simultaneously. The acetylcholine(ACh) and choline levels in microdialysate were measured with high performance liquid chromatography-post column immobilized enzyme reactor-electrochemical detection. **RESULTS** The extracellular ACh level was lower in model group than in control group after striatal

perfusion with NaN₃ for 90 min. The decrease reached a minimum of 10.0%, at 60 min after stopping perfusion with NaN₃. Then the ACh level partially recovered. However, it did not reach the control level during 180 min of recovery. Pretreatment with Duxil alleviated the decrease in ACh induced by NaN₃ at 30 and 60 min after stopping perfusion with NaN₃. **CONCLUSION** Perfusion with NaN₃ caused the deficiency of cholinergic nerve activity in local brain, and it could be used as an acute model of sustained decrease in ACh level.

Key words: sodium azide; microdialysis; brain; acetylcholine

* Corresponding author.