

丙二醛对大鼠空间学习、记忆能力及海马 CA1 区超微结构的影响*

陈菁菁 方垂 李芳序 朱泽瑞 印大中**

蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081

摘要 研究了氧化应激毒性中间产物丙二醛 (MDA) 对 SD 大鼠空间学习、记忆的影响。用 Morris 水迷宫方法研究发现, 经侧脑室注射丙二醛的大鼠在定位航行试验中寻找水下平台的逃避潜伏期极显著地延长, 同时在空间探索试验中 120 s 内穿台次数减少, 说明较高浓度的丙二醛能导致大鼠的空间学习、记忆能力降低。电镜观察研究发现, 处理组大鼠海马 CA1 区神经元细胞内线粒体变形、嵴消失, 说明不同浓度的丙二醛在非氧自由基条件下也能直接对大鼠海马 CA1 区神经元造成一定程度的损伤 [动物学报 53 (6): 1041-1047, 2007]。

关键词 SD 大鼠 丙二醛 学习记忆 Morris 水迷宫 侧脑室注射

Effects of malondialdehyde on spatial learning, memory, and ultra-microstructure of the hippocampal CA1 area of SD rats*

CHEN Jing-Jing, FANG Chui, LI Fang-Xu, ZHU Ze-Rui, YIN Da-Zhong**

Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Abstract The damaging effects of malondialdehyde (MDA) on the spatial learning and memory capability of SD rats were investigated by using the Morris water-maze and transmission electron microscope (TEM) techniques. Lateral cerebral ventricular injection of MDA was found to significantly prolong the escape latency of rats during place navigation. The incidence (n/120 s) of crossing the area where the platform had been located on previous trials was reduced in the spatial probe test. The TEM study showed that mitochondria of neurons were deformed and their cristae disappeared in the hippocampal CA1 area. Our data demonstrate that relatively high concentrations of MDA may reduce spatial learning and memory capability and damage neurons in the hippocampal CA1 area of rats [Acta Zoologica Sinica 53 (6): 1041-1047, 2007].

Key words SD rats, Malondialdehyde, Learning and memory, Morris water-maze, Lateral cerebral ventricle injection

在多种应激状态下, 如在脂质过氧化和非酶糖基化过程中, 动物体内的不饱和醛酮类代谢中间产物如丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和 4-羟基壬烯醛 (4-Hydroxynonenal, HNE) 的平衡水平上移, 不断积累。这些物质具有生物活性, 能与含氮的生物分子发生交联, 使动物组织硬化, 造成伤害 (Kikugawa et al., 1980; Esterbauer et al., 1990, 1991)。作为脂质氧化的主要毒性中间产物, 丙二醛在老年色素类生物垃圾以及衰老相关的蓄积

产物的形成过程中起着核心作用。研究表明, 在患病及衰老的动物和人体内, 脂质过氧化物 (其中约 85% 为丙二醛) 明显升高 (Esterbauer et al., 1990, 1991)。本实验室以前的研究发现丙二醛能使小鼠出现“疲劳样”体能下降和抑制性脑电波 (李莉等, 2006)。尽管动物体内对这些不饱和醛酮类物质的毒化作用设有严密的防御体系, 如这些应激醛可被谷胱甘肽或其它含巯基氨基酸还原、被醛氧化酶氧化等, 但这些防御作用有一定的限度 (Poli

2007-01-19 收稿, 2007-09-20 接受

* 国家高技术研究发展计划 (2007AA02Z433) 和湖南省科技厅重点项目 (06FJ3001) [This study was supported by the National High-tech Research Development Project (2007AA02Z433) and the Important Research Project of Sci-tech Burro of Hunan Province (06FJ3001)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: dazhongyin@hotmail.com

© 2007 动物学报 Acta Zoologica Sinica

and Schaur, 2000; Siems et al., 1998; Davies, 2000)。由于这些毒性不饱和醛酮不断地对动物体内的各个组织器官(包括大脑组织)进行攻击(Yin, 1996; Yin and Chen, 2005; Stadtman, 2006; Stadtman et al., 1992; Traverso et al., 2004), 造成对神经细胞和组织中的蛋白质, 如 β 淀粉样蛋白(A β)、 α -共核蛋白、tau 蛋白等的共轭交联等伤害作用, 而形成多种与老化相关的蛋白质聚合物, 使之丧失正常功能。这些蛋白质聚合物若无法被机体清除则造成增龄性蓄集, 从而最终导致老年退行性疾病和衰老相关的种种病变(Yin and Chen, 2005; Gregory et al., 2006; Laferla and Oddo, 2005)。

有研究表明, 四羟基壬烯醛能导致广泛的神经元细胞凋亡, 大大降低乙酰胆碱转移酶的活性(Bruce-Keller et al., 1998)。由此可以推测丙二醛也具有类似的作用, 如攻击神经元细胞功能蛋白, 改变神经元细胞功能蛋白的活性, 影响神经元细胞的正常功能。随着丙二醛对神经元细胞功能蛋白攻击作用的不断累积, 导致神经元细胞的凋亡, 整体上则表现为大脑学习记忆能力的损伤和衰退(Yin, 1996; 李国林等, 2004)。

学习和记忆是脑的高级功能。学习是指人或动物获得外界知识的神经过程, 记忆是指将获得的知识储存和读出的神经过程。然而, 应激产物的积累会抑制甚至破坏学习和记忆的功能(Butterfield et al., 2001)。本试验通过侧脑室注射不同浓度的丙二醛, 用 Morris 水迷宫来测定大鼠的空间学习记忆水平(D'Hooge and De-Deyn, 2001); 又由于海马 CA1 区被认为与空间学习记忆密切相关, 故采用透射电镜观察大鼠海马 CA1 区神经元细胞, 进而探讨丙二醛对大脑的损伤作用及其机理(Huang and Kandel, 2006; Rossato et al., 2006)。

1 材料与方法

1.1 试验动物及分组

三月龄的雄性 SD 大鼠购自湖南省农科院动物饲养房。43 只大鼠随机分为 5 组, 其中 200 mmol/L 丙二醛处理组 10 只, 20 mmol/L 丙二醛处理组 10 只, 2 mmol/L 丙二醛处理组 10 只, 生理盐水对照组 10 只, 空白对照组 3 只(因已有生理盐水组, 此空白组作为附带性数据提供参考)。手术后部分老鼠因为伤口感染而死, 最后每组大鼠的只数分别为: 200 mmol/L 丙二醛处理组 9 只, 20 mmol/L 丙二醛处理组 7 只, 2 mmol/L 丙二醛处理组 8 只, 生

理盐水对照组 7 只, 空白对照组 3 只。

1.2 试剂

四甲氧基丙烷(1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane, TMP, 购自瑞士 Fluka 公司); 戊巴比妥钠(纯度 > 99.0%, 购自国药集团化学试剂有限公司); 超纯水由 Milli-Q 系统纯化(Millipore China Limited), 电导率 ≥ 18.2 M Ω .cm。其它均为常规试剂。

取 TMP 337.8 μ l, 加入 1 mol/L 的 HCl 2 ml, 充分摇匀, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴 2.5 min (水浴时间通过预实验结果选定), 取出后置于冰水中, 用 6 mol/L 的 NaOH 约 0.4 ml 调节其 pH 至 7.4, 最后用 1 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液(PBS)定容到 10 ml, 摇匀。取 200 mmol/L 丙二醛 0.5 ml, 用 1 mol/L pH 7.4 的 PBS 稀释至 5 ml, 配制成 20 mmol/L 丙二醛; 取 200 mmol/L 丙二醛 0.05 ml, 用 1 mol/L pH 7.4 的 PBS 稀释至 5 ml, 配制成 2.0 mmol/L 丙二醛。

取 300 mg 戊巴比妥钠溶解于 5 ml 超纯水中配制成 60 mg/ml 戊巴比妥钠。

1.3 仪器设备

江湾 C 型动物脑立体定位仪(上海奥尔特生物科技有限公司生产), Morris 水迷宫(中南大学湘雅医学院附二医院提供), Jem-1230 型透射电镜(日本, JEOL 公司生产)。

1.4 方法

1.4.1 侧脑室注射(Sharma and Gupta, 2002)

将 SD 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉后, 固定于脑立体定位仪上, 调节定位仪使动物头部左右对称, 前后囟处于同一水平面上。大鼠头部用碘伏消毒, 切开两耳连线中点偏右约 0.5 cm 的头皮, 切开颅骨骨膜, 暴露前囟。用 3% 过氧化氢擦涂颅骨, 使冠状缝和矢状缝显露清楚。根据大鼠脑图谱(Paxinos and Watson, 1986)确定侧脑室(前囟向后 1.2 mm, 向左旁开 1.3 mm, 颅骨表面下 3.0 mm)位置。用三棱针在此位置上方颅骨相应部位开 1 小孔(孔径约 2 mm), 将一不锈钢针管(直径约 0.9 mm)置于脑室内。另外, 在颅骨上植入 3 个不锈钢小螺丝(直径约 1.8 mm), 用牙科水泥将针管和小螺丝一并固定于颅骨上, 并将管口用活塞封住。手术后让大鼠恢复 7 天, 并在恢复期间每天肌注 0.2 ml 80 万单位的青霉素以防感染。给药时用微量注射器抽取 5 μ l 生理盐水或不同浓度的丙二醛溶液, 将针头固定在脑立体定位仪上, 计算并调准方位后将针头沿针管缓慢注入侧脑室, 在

5 min–10 min 内注完, 各组动物注射后均留针 10 min 后缓慢将针头拔出, 插入新消毒活塞。每两天注射一次, 连续给药 7 次后休息 1 周。空白对照组则不做任何处理。

1.4.2 Morris 水迷宫试验 (Morris, 1984)

水迷宫为直径 130 cm、高 50 cm 的圆形水池, 水深 30 cm、水温保持 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 水面均匀覆盖一层大小相似的深色塑料颗粒。池壁上标有东南西北 4 个入水点, 它们将水池等分为 4 个象限, 在第一象限正中离池壁 33 cm 处放一个直径为 9 cm、高 29 cm 的圆形透明平台, 平台顶低于水面 1 cm。迷宫上方安置摄像机, 同步记录大鼠运动轨迹。训练期间迷宫外参照物保持不变。

定位航行试验 (Place navigation) 用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的能力。实验历时 5 天, 第一天让大鼠自由游泳 2 min, 第一个训练日结束后, 清洗泳路侧壁以消除嗅觉提示; 从第二天起, 每天训练 4 次, 训练时随机选择一个入水点, 将大鼠面向池壁放入水中, 观察并记录大鼠寻找以及爬上平台的路线图、所需时间 (逃避潜伏期) 及游泳速度。4 次训练大鼠分别从不同的入水点入水, 如果大鼠在 120 s 内未找到平台, 需将其引至平台滞留 30 s。这时潜伏期记为 120 s, 每次训练间隔 30 min 以上。

空间探索试验 (Spatial probe test) 用于测量大鼠学会寻找平台后对平台空间位置记忆的能力。即在第五天的第 5 次训练时撤除平台, 然后任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中, 测其在 120 s 内在各象限的游泳距离及其占总距离的百分比, 记录在 120 s 内跨过各象限平台相应位置的次数及其占总次数的百分比并记录大鼠在 120 s 内搜索平台的路线图。

1.4.3 电镜样品的制备

取处理组和对照组大鼠各 3 只, 麻醉后, 掀开颅盖, 迅速向颅腔滴入 4% 多聚甲醛固定液, 立即取大鼠左侧海马 CA1 区 (平外侧膝状体水平) $2\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 5\text{ mm}$, 固定于 4% 多聚甲醛的固定液中。行常规电镜标本包埋与铅铀双染色, 每份标本制作 2 张铜网, 每张铜网沿左上向右下方向移动并随机拍摄 80 000 倍显微照片。

1.5 数据处理

所有数据以均数和标准差 (Means \pm SD) 或变异系数 (CV = s/\bar{x}) 表示; 定位航行试验中的逃离时耗数据经对数 Log (X) 变换后采用 DPS2000 统

计软件进行 Two-factor ANOVA 分析; 空间探索试验中的穿台次数采用非参量统计 Wilcoxon 秩和检验。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫试验

2.1.1 定位航行试验

将 34 只 SD 大鼠采用 5 种不同处理、训练 5 天共 21 次, 获得原始数据 714 个 ($n = 34 \times 21 = 714$, 单位: ms)。用 χ^2 检验法对原始数据进行拟合优度检验, 发现数据不符合正态分布, 且方差与平均数的平方成正比。将原始数据进行对数 Log (χ) 变换后符合正态分布 $N(4.76, 0.39)$, 采用 Bartlett test 进行方差齐性检验, 各处理的方差整齐 [处理 (A) 间: $\chi^2_{A,4} = -3.2902$; 天数 (B) 间: $\chi^2_{B,4} = -5.9551$; $n = 714$], 具备方差分析的条件。将 5 种处理、训练 5 天的逃避潜伏期做图, 如图 1。

从图 1 可以看出, 随着训练时间的延长, 不同处理组逃避潜伏期的时间缩短, 但 3 种不同浓度的丙二醛处理组的逃避潜伏期缩短的趋势比空白对照组或生理盐水对照组更加缓慢, 且三种不同浓度的丙二醛处理组的逃避潜伏期都长于空白对照组或生理盐水对照组。这说明侧脑室注射丙二醛对 SD 大鼠的逃避潜伏期有影响, 且这种影响随着时间的延长而加强。

方差分析表明, 5 种不同的处理之间 ($F_{4,689} = 22.9972$) 以及不同训练天数之间 ($F_{4,689} = 26.7413$) 的逃避潜伏期差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$); 处理与训练天数之间的交互影响极显著 ($F_{16,689} = 48.7234$; $P < 0.01$)。

将不同处理组之间的逃避潜伏期平均数采用 Duncan 检验法进行多重比较, 发现 2.0 mmol/L 和 20 mmol/L 丙二醛处理组的逃避潜伏期最长, 分别为 92.6 s 和 90.5 s; 生理盐水对照组和空白对照组最短, 分别为 65.3 s 和 65.6 s; 200 mmol/L 丙二醛处理组为 82.1 s (逃避潜伏期越短说明空间学习记忆能力越强)。

三个不同浓度的丙二醛处理组与空白对照组的逃避潜伏期平均数比较, 浓度由低向高分别相差 27.1 s、25.0 s 和 16.5 s, 与生理盐水对照组比较分别相差 27.4 s、25.3 s 和 16.8 s, 差异均达到极显著水平; 而三个不同浓度的丙二醛处理组之间以及空白对照组与生理盐水对照组之间的差异均不显著。

不同训练天数之间逃避潜伏期平均数比较, 第

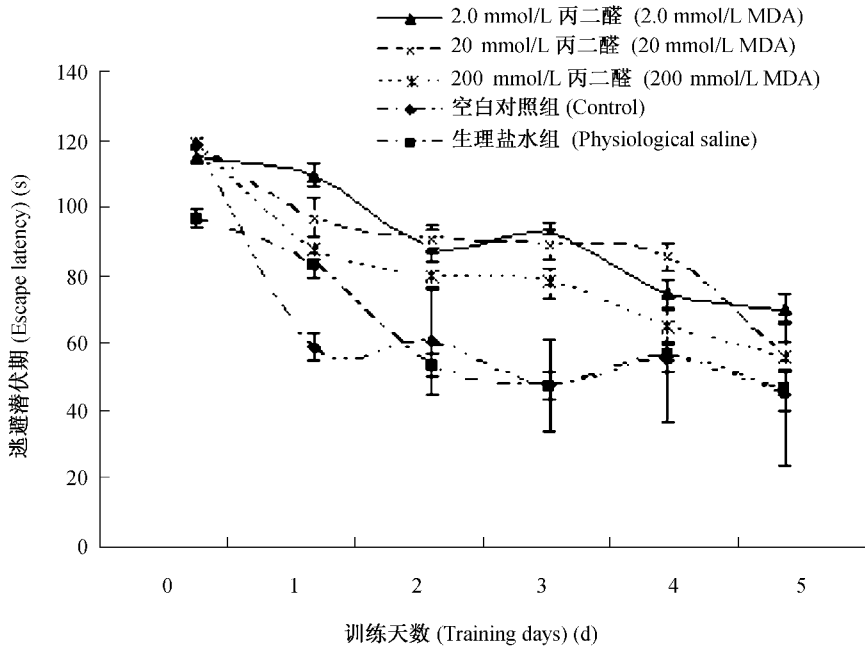


图 1 丙二醛处理 SD 大鼠在水迷宫定位航行试验中的逃离时耗（逃避潜伏期）随天数的变化

采用 Two-factor ANOVA 分析, 不同处理间 $F_{4,689} = 22.9972$; 不同训练天数之间 $F_{4,689} = 26.7413$; 交互影响 $F_{16,689} = 48.7234$; $n = 714$ 。

Fig.1 The escape latency of MDA treated SD rats during place navigation in the Morris water-maze test

Two-factor ANOVA, treated groups $F_{4,689} = 22.9972$; training days $F_{4,689} = 26.7413$; interaction $F_{16,689} = 48.7234$; $n = 714$ 。

一天与第四天 ($d = 19.8$ s)、第五天 ($d = 32.2$ s) 以及第二天与第五天 ($d = 19.6$ s) 的差异极显著 ($d > LSR_{0.01}$, $P < 0.01$); 第一天与第三天 ($d = 16.3$ s)、第二天 ($d = 12.6$ s) 以及第三天与第五天 ($d = 15.9$ s) 的差异显著 ($d > LSR_{0.05}$, $P < 0.05$); 其余各天之间的差异均不显著 ($d < LSR_{0.05}$, $P > 0.05$)。这表明侧脑室注射丙二醛对 SD 大鼠的逃避潜伏期的影响极显著, 不同浓度的丙二醛处理逃避潜伏期平均数之间差别不明显, 空白对照组与生理盐水对照组没有差别。

不同训练天数之间的逃避潜伏期平均数比较, 随着训练天数的增加, 逃避潜伏期逐渐缩短。这体现了大鼠对水下平台位置的寻找有一个逐渐学习记忆的过程。多重比较的结果也说明训练作用最明显的是试验开始的头两天。

2.1.2 空间探索试验

将 34 只 SD 大鼠经五种不同处理后进行空间探索试验, 得大鼠在 120 s 内的穿台次数的平均数如图 2。

从图 2 可以看出, 五种处理的大鼠在 120 s 内的穿台次数的平均数为: 生理盐水对照组最高, 为 4.14 次; 20 mmol/L 丙二醛处理组最低, 为 2.00

次; 其余各处理依次为: 空白对照组 3.67 次; 2.0 mmol/L 丙二醛处理组 3.38 次; 200 mmol/L 丙二醛处理组 2.33 次。

经 Wilcoxon 秩和检验 (图 2), 生理盐水对照组与空白对照组之间的差异未达到显著水平 ($u = -0.3419$, $P > 0.05$); 三个不同浓度的丙二醛处理组与空白对照组或生理盐水对照组之间的比较, 在 2.0 mmol/L 到 200 mmol/L 的浓度范围内随着丙二醛浓度的升高 u 值增大 (与空白对照组比 u 值分别为 0.3062、0.7977 和 0.9245; 与生理盐水对照组比 u 值分别为 0.6365、1.3416 和 1.3761), 但差异均未达到显著水平 ($P > 0.05$)。

将 34 只 SD 大鼠空间探索试验中 120 s 内大鼠在各象限滞留时间的平均数进行比较, 得图 3 所示结果。

从图 3 可以看出, 五种不同处理的大鼠在各象限滞留的时间不同。经 Two-factor ANOVA 分析, 各处理之间的影响达到极显著水平 ($F_{4,29} = 61.198$, $P < 0.01$)。变异系数分析表明, 空白对照组的变异系数 (CV) 最大 (变异系数越大说明对水下平台的位置记忆越准确), 为 26.33%; 生理盐水对照组与 2.0 mmol/L 丙二醛处理组的变异系

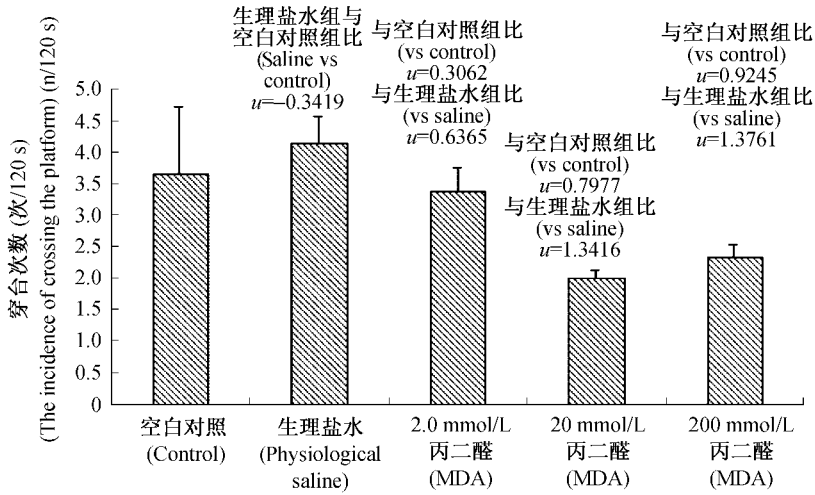


图 2 丙二醛处理对大鼠空间探索试验穿台次数的影响

由于数据不具备方差分析条件，故采用 Wilcoxon 秩和检验。 $u_{0.05} = 1.645$ ：当 $|u| < 1.645$ 时， $P > 0.05$ ； $n = 34$ 。

Fig.2 The incidence of crossing the platform position of MDA treated rats in spatial probe trials

Since the data can not use ANOVA, the Wilcoxon rank-sum test was used instead. $u_{0.05} = 1.645$: If $|u| < 1.645$, then $P > 0.05$; $n = 34$.

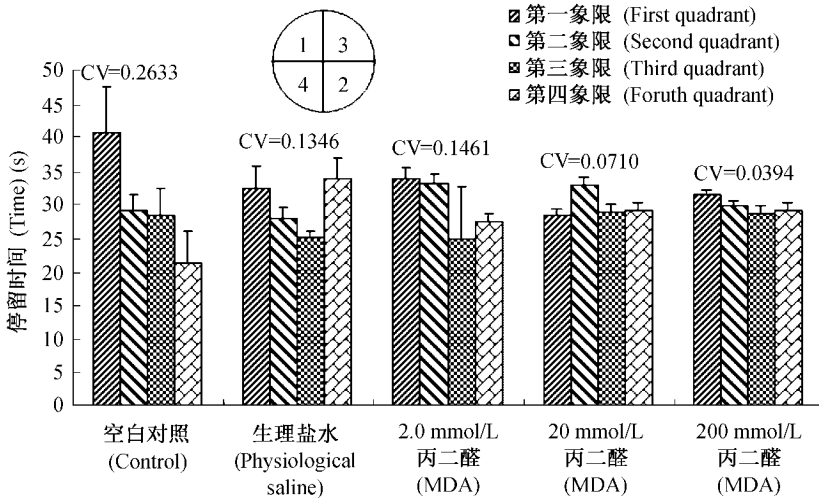


图 3 不同丙二醛浓度处理的大鼠在空间探索试验中在四个象限滞留时间的比较

采用 Two-factor ANOVA 分析，处理间： $F_{4,29} = 61.198$ ， $P < 0.01$ ； $n = 34$ 。

Fig.3 Comparison of the navigation period of MDA treated rats in four quadrants during the spatial probe test

Using Two-factor ANOVA, between treated groups: $F_{4,29} = 61.198$, $P < 0.01$; $n = 34$.

数十分接近，分别为 13.46% 和 14.61%；而三种不同浓度的丙二醛处理组的变异系数随着丙二醛浓度的升高而逐渐降低，其中 20 mmol/L 丙二醛处理组为 7.10%，200 mmol/L 丙二醛处理组为 3.94%。数据表明 20 mmol/L 丙二醛和 200 mmol/L 丙二醛影响了大鼠对水下平台所在象限的准确记忆，而 2.0 mmol/L 丙二醛的影响不明显，体现了一定的浓度依赖性。

2.2 电镜观察

3 只对照组大鼠海马 CA1 区神经元细胞线粒体均成椭圆形，线粒体嵴清晰可辨（图 4A），而 9 只不同浓度的丙二醛处理组（ $n = 3$ ）大鼠海马 CA1 区神经元细胞内全部线粒体都有不同程度的变形，嵴变模糊或消失（图 4B、C、D），且丙二醛处理的浓度越高，线粒体的形状变化越大，从随机拍摄的 36 张电镜照片中均能观察到上述现象。说明不同浓度的丙二醛对大鼠海马 CA1 区神经元细胞造成了一定程度的损伤。

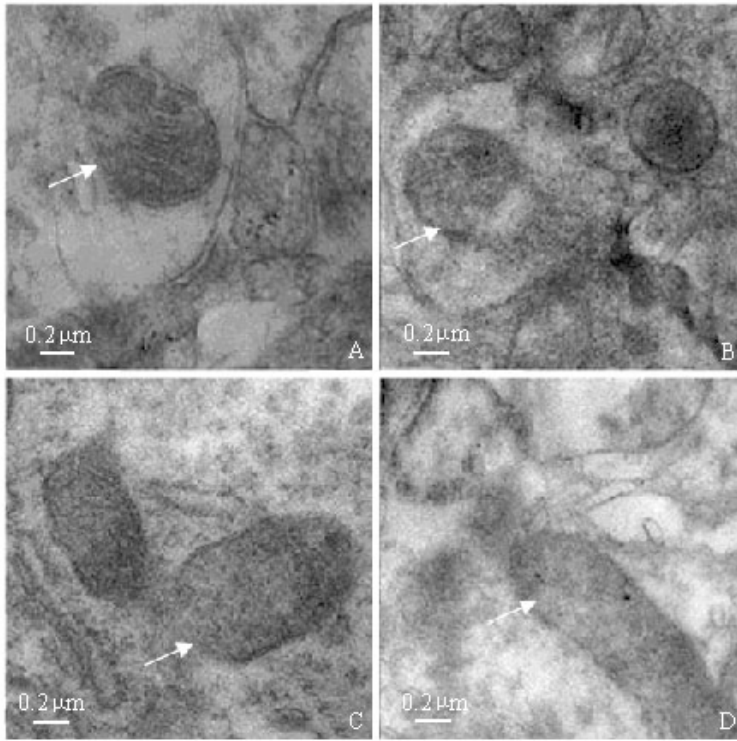


图4 丙二醛处理大鼠的海马 CA1 区神经元细胞透射电镜照片($\times 80\ 000$) ($n = 3$)

A: 对照组. B: 2.0 mmol/L 丙二醛组. C: 20 mmol/L 丙二醛组. D: 200 mmol/L 丙二醛组. 箭头所指处为线粒体.

Fig.4 The transmission electron microscope photos of hippocampus CA1 area of MDA treated rats ($\times 80\ 000$) ($n = 3$)

A: Control group. B: 2.0 mmol/L MDA group. C: 20 mmol/L MDA group. D: 200 mmol/L MDA group. Mitochondria are indicated with arrows.

3 讨论

侧脑室注射丙二醛能引起 SD 大鼠定位航行能力(图1)和空间探索能力(图2、图3)下降,表明不饱和醛酮类物质的羰基毒化作用可直接影响 SD 大鼠大脑神经元细胞的正常功能。经丙二醛处理的大鼠较对照组要花费更多的时间学会寻找并记住水下平台,提示丙二醛可能对大鼠的大脑神经元造成了伤害。

电镜观察证实:不同浓度的丙二醛处理使大鼠海马 CA1 区神经元细胞线粒体变形、嵴消失(图4B、C、D),这从形态学的角度印证了 Morris 水迷宫(Morris, 1984)的试验结果,表明丙二醛对神经元可造成局部组织不可逆转的损伤,从而引起大鼠空间学习记忆能力的降低。

越来越多的研究表明(Rofina et al., 2004; Butterfield et al., 2006; Williams et al., 2006),在氧化应激损伤发生,进而在氧自由基迅速地消失以后,生物分子中衍生的毒性不饱和醛酮(也可源自非酶糖基化)会持续不断地对动物体内的各个组织器官(包括大脑组织)进行攻击,可形成多种与老

化相关的蛋白质聚合物。这些蛋白质聚合物若无法被机体清除则造成增龄性蓄集(Yin, 1996)。这种损伤与蓄积若在身体的某些局部被加速则造成老年退行性疾病以及与衰老相关的种种病变。这就是我们最近在国际上提出的广义衰老学说的核心内容(Yin and Chen, 2005)。我们的学说认为,作为与能量代谢相关的核心生化副反应,羰基应激过程及其失修性累积,是所谓亚健康 and 亚病态的关键生化表型,睡眠过程对于这类毒性羰基的清除很可能就是中枢神经系统恢复正常的生理功能的重要的生化机制。羰基类毒素对神经细胞和组织中的蛋白质,如 β 淀粉样蛋白($A\beta$)、 α -共核蛋白、tau 蛋白造成共轭交联伤害,形成多种与老化相关的蛋白质聚合物,使之逐渐丧失正常功能,也许便是与衰老相关的神经退行性疾病的重要起因(李国林等, 2004; Yin and Chen, 2005)。本项研究的结果从一个侧面验证和支持了我们提出的关于羰基应激衰老机制的假说——早期轻微的羰基应激是衰老和老年退行性疾病的“同根病”的生化病根。这个损伤可由羰基类毒素(如丙二醛)直接引发从而造成交联积累,无需氧自由基及非酶糖基化的参与。

总之, 本研究的结果表明, 侧脑室注射丙二醛可引起 SD 大鼠空间学习记忆能力降低, 并能造成大鼠海马 CA1 区神经元细胞内线粒体变形和一定程度的损伤。其主要原因是由于氧化应激的毒性中间产物丙二醛造成的神经元及相关细胞组分的累积性伤害。本结果从一定程度上揭示了羰基应激与神经退行性疾病的生化相关性及其对动物学习记忆能力的损伤作用。

参考文献 (References)

Bruce-Keller AJ, Li YJ, Lovell MA, Kraemer PJ, Gary DS, Brown RR, Markesbery WR, Mattson MP, 1998. 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, damages cholinergic neurons and impairs visuospatial memory in rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57 (3): 257–267.

Butterfield DA, Reed T, Perluigi M, De Marco C, Coccia R, Cini C, Sultana R, 2006. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neurosci. Lett.* 397 (3): 170–173.

Butterfield DA, Howard BJ, LaFontaine MA, 2001. Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age related neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Current Med. Chem.* 8: 815–828.

Davies KJA, 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB. Life* 50 (4–5): 279–289.

D'Hooge R, De-Deyn PP, 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 36 (1): 60–90.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H, 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1): 81–128.

Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ, 1990. Aldehydes formed by lipid peroxidation: Mechanisms of formation, occurrence and determination. In: Vigo-Pelfrey C ed. *Membrane Lipid Oxidation*, vol. I. Boca Raton: CRC Press Inc. 239–268.

Huang YY, Kandel ER, 2006. Age-related enhancement of a protein synthesis-dependent late phase of LTP induced by low frequency paired-pulse stimulation in hippocampus. *Learn. Mem.* 13 (3): 298–306.

Gregory GC, Macdonald V, Schofield PR, Krill JJ, Halliday GM, 2006. Differences in regional brain atrophy in genetic forms of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27 (3): 387–393.

Laferla FM, Oddo S, 2005. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends. Mol. Med.* 11 (4): 170–176.

Li G, Li L, Yin D, 2004. Carbonyl stress may represent the upstream molecular cause of Alzheimer's disease. *Chin. J. Geriatr.* 23 (8): 591–594.

Li L, Chen J, Li F, Zhu Z, Liao Y, Yin D, 2006. Toxic effects of oxidative

stress product malondialdehyde (MDA) on mice physical stamina and metabolism *in vivo*. *J. Nat. Sci. Hunan Normal Univ.* 29: 97–101.

Kikugawa K, Tsukuda M, Kurechi T, 1980. Studies on peroxidized lipids. I. Interaction of malondialdehyde with secondary amine and its relevance to nitrosamine formation. *Chem. Pharm. Bull.* 28 (11): 3323–3331.

Morris R, 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 11: 47–64.

Paxinos G, Watson C, 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press.

Poli G, Schaur RJ, 2000. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB. Life* 50 (4–5): 315–321.

Rofina JE, Singh K, Skoumalova-Vesela A, van Ederen AM, van Asten AJ, Wilhelm J, Gruys E, 2004. Histochemical accumulation of oxidative damage products is associated with Alzheimer-like pathology in the canine. *Amyloid.* 11 (2): 90–100.

Rossato JI, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M, 2006. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem.* 13 (4): 431–440.

Sharma M, Gupta YK, 2002. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sci.* 71 (2): 2489–2498.

Siems WG, Pimenov AM, Esterbauer H, Grune T, 1998. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in thymocytes as an effective secondary antioxidative defense mechanism. *J. Biochem.* 123 (3): 534–539.

Stadtman ER, 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* 40 (12): 1250–1258.

Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM, Floyd RA, 1992. Protein modification in aging. *EXS.* 62: 64–72.

Traverso N, Menini S, Maineri E, Patriarca S, Odetti P, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA, 2004. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59 (9): B890–895.

Williams TJ, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA, 2006. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27 (8): 1094–1099.

Yin D, 1996. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic. Biol. Med.* 21 (6): 871–888.

Yin D, Chen K, 2005. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Exp. Gerontol.* 40 (6): 455–465.

李 莉, 陈菁菁, 李芳序, 朱泽瑞, 廖艳阳, 印大中, 2006. 氧应激毒性产物丙二醛 (MDA) 对小鼠体能的影响及其体内代谢. *湖南师范大学自然科学学报* 29: 97–101.

李国林, 李 莉, 印大中, 2004. 羰基应激与阿茨海默病的上游分子病因. *中华老年医学杂志* 23 (8): 591–594.