

的双重损害。如能早期发现这些肾损害,通过大剂量激素治疗,可逆转病情。反之,如系统性红斑狼疮(SLE)患者已出现肾小球硬化等系列症状时,则逆转困难,甚至无法逆转<sup>[8]</sup>。故了解 LN 患者的病理类型,对病情的治疗和预后的判断具有重要的意义。有研究报道,为了解 SLE 患者 Cys C 检测的临床意义及其与不同病理类型 LN 的关系,利用颗粒增强透射免疫比浊法测血清 Cys C 浓度,对 LN 患者做肾小球评分及肾小管间质评分,结果发现Ⅲ、Ⅳ、V 型 LN 患者的血清、尿 Cys C 浓度与健康对照组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )<sup>[8-14]</sup>。Ⅰ、Ⅱ型患者的血清、尿 Cys C 浓度与健康对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。血 Cys C 与肾小球评分呈正相关( $r=0.741, P<0.01$ ),尿 Cys C 与肾小管间质评分呈正相关( $r=0.810, P<0.01$ )。研究认为 Cys C 能反映 SLE 患者肾小球和肾小管间质双重损害及损害程度,是 SLE 患者早期肾损害的敏感指标。Cys C 与 LN 病理分型存在一定的关系,可能是反映不同病理类型 LN 肾损害程度差异的敏感指标。

张旭光等<sup>[15]</sup>对 54 例肾病综合征患者分别用高效液相色谱法、乳胶增强散射免疫比浊法及酶比色法对泼尼松、Cys C 及肌酐水平进行检测,结果发现治疗前除微小病变、肾病综合征外,健康对照组和肾病综合征组 Cys C 与肌酐浓度差异均有统计学意义;治疗后泼尼松保持稳态血药浓度时,Cys C 浓度降低,且相对稳定而肌酐浓度变异较 Cys C 大,但与治疗前相比差异无统计学意义,认为 Cys C 是肾病综合征疗效观察更敏感的指标,泼尼松与 Cys C 联合检测更具有临床价值。

综上所述,Cys C 对早期诊断各种急慢性肾脏病患者具有重要价值,在心血管及其他一些疾病中还起着相当重要的作用。相信随着对 Cys C 的不断深入研究,其将显示出越来越重要的临床价值,血清 Cys C 的检测对临床各种肾病中的病情发生、发展、治疗和预后评估具有良好的作用,值得推广应用。

### 参考文献

- [1] 赵林双,向光大,浦金辉,等. 糖尿病肾病患者血清 AT1 受体和  $\beta 1$  受体自身抗体与血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志,2011,27(10):833-835.
- [2] Gouwy M, Struyf S, Verbeke H, et al. CC chemokine ligand-2 synergizes with the nonchemokine G protein-coupled receptor ligand fMLP in monocyte chemotaxis, and it cooperates with the TLR ligand LPS via induction of CX-CL8[J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(3): 671-680.
- [3] Almeida JC, Zelmanovitz T, Vaz JS, et al. Sources of pro-

- tein and polyunsaturated fatty acids of the diet and microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus[J]. J Am Coll Nutr, 2008, 27(5): 528-537.
- [4] Bansal G, Divietro JA, Kuehn HS, et al. RGS13 controls G protein-coupled receptor-evoked responses of human mast cells[J]. J Immunol, 2008, 181(11): 7882-7890.
- [5] 李军, 陈桂林. 血清光抑素 CYS-C, 纤维蛋白原, C 反应蛋白对糖尿病肾病的早期诊断价值的探讨[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(12): 61-62.
- [6] 刘桂美, 刘丽秋. 血清光抑素 C 与糖尿病肾病的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(1): 107-109.
- [7] 礼跃, 王倩, 常颖. 血清胱抑素 C 在 2 型糖尿病肾功能损伤早期诊断中的价值[J]. 山东医药, 2011, 51(39): 44-45.
- [8] 宋志伟, 冯磊光, 张兰萍, 等. 胱抑素 C 与狼疮肾炎病理分型的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 175-176.
- [9] Tarif NA. Serum cystatin C as a marker of renal function in patients with acute renal failure[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2008, 19(6): 918-923.
- [10] Devarajan P. Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury[J]. Semin Nephrol, 2007, 27(6): 637-651.
- [11] Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, et al. Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3,418 individuals with CKD[J]. Am J Kidney Dis, 2008, 51(3): 395-406.
- [12] Waked JS, Hammad DN. Serum cystatin C: a surrogate marker for the characteristics of peritoneal membrane in dialysis patients[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2009, 20(2): 227-231.
- [13] 姚锦绣, 梁红峰, 苏勇. 血清胱抑素 C 的测定在肾脏疾病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 3(9): 912-915.
- [14] Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans[J]. Clin Transl Sci, 2008, 1(3): 200-208.
- [15] 张旭光, 赵姝姝, 李加村, 等. 泼尼松和胱抑素 C 及肌酐联合检测在肾病综合征中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(18): 2223-2224.

(收稿日期: 2012-09-14 修回日期: 2012-10-12)

## 老年痴呆症的药理实验方法研究进展

崔 雯, 邓小细 综述, 钟振国<sup>△</sup>审校(广西中医药大学, 南宁 530001)

【关键词】 阿尔兹海默病; 药理实验; 细胞实验

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 07. 050 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)07-0859-03

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD) 即所谓的老年痴呆症, 是一种进行性发展的致死性神经退行性疾病。随着现代社会人口结构老龄化的发展, 其发病率呈不断增加的趋势, 已引起国内外学者的广泛关注。而老年性痴呆在老年人的疾病

谱和死亡谱中已占有十分重要且突出的地位, 并已成为继心脏病、癌症、卒中之后第四位致死原因。随着社会老龄化的迅猛发展, 老年痴呆必将成为我国不可忽视的卫生和社会问题。现对近年来进行老年痴呆症的药理研究方法作一综述。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: 348281842@qq. com.

## 1 常用 AD 模型

**1.1  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )或多肽诱发的模型** AD 退行性改变可能是由于神经细胞过度凋亡引起。 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )是构成 SP 的核心成分,对神经元具有直接毒性作用,且被认为是神经元凋亡的诱导因素。A $\beta$  具有神经毒性作用,用微型渗透压泵给大鼠脑室内灌注 A $\beta$  或给单侧(或双侧)海马注射 A $\beta$ 1-28 片段后,大鼠产生认知功能损害,且脑内 ChAT 活性显著下降,出现 A $\beta$  沉积。 $\beta$ -淀粉样肽是具有象征 AD 特征老年斑的主要成分,在 AD 胆碱能神经功能紊乱的病理学发展中可能发挥关键作用。在原代海马神经细胞培养中,一定浓度的 A $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-40 及 A $\beta$ 25-35 片段可以引起细胞凋亡或者是抑制细胞的突起,可以直接损伤细胞膜,引起  $\text{Ca}^{2+}$  大量进入细胞内导致细胞死亡。

**1.2 体外培养神经细胞 A $\beta$  损伤模型** 目前发现 A $\beta$  与细胞凋亡关系密切,A $\beta$  可分别由凋亡基因表达及凋亡相关酶活性改变、促进自由基产生、钙离子平衡紊乱、线粒体功能紊乱、NF- $\kappa$ B 激活等多途径诱导细胞凋亡,参与 AD 的发生和发展。以无菌去离子水将 A $\beta$  配制成浓度为 1 mmol/L 的溶液,储存于 -20 °C 冰箱中备用,用前置于 37 °C 孵箱温育过夜使其寡聚并增强毒性。用时加入神经细胞培养液中,终浓度 10~25  $\mu$ mol/L,与细胞共同孵育 24 h,测定相关指标以判定 A $\beta$  毒性及药物对神经细胞的保护作用。其中第 25~35 位氨基酸构成的肽,在体外水溶液中可形成稳定的聚集,呈  $\beta$ -片层状二级结构,具有神经毒作用,常用作体外神经毒实验的 AD 模型<sup>[1-3]</sup>。

**1.3 可复制 AD 模型细胞** PC12 是一种嗜铬细胞瘤细胞株,在神经生长因子的持续作用下可引起其表型明显改变,获得交感神经细胞的一系列特征,与人成神经细胞瘤细胞株(SH-SY5Y)同样均可作为复制 AD 模型的细胞,现已为世界众多学者广泛应用<sup>[4-5]</sup>。

**1.4 快速老化小鼠(senescence accelerated mice,SAM)模型** 快速老化小鼠分为快速老化亚系(senescence accelerated mouse/prone,SAM-P)及抗快速老化亚系(senescence accelerated mouse/resistance,SAM-R)。SAM-P 品系中,有两个亚品系 P8 和 P10 除了具有 P 品系的一般老化症状外,还伴随着快速老化出现的学习记忆力障碍和低恐怖紧张状态,为脑老化痴呆模型小鼠。两亚系的共同特点是均具有认知障碍,且在渡过长生长期后,快速老化的自然发生与临床痴呆的渐进性发生极为相似<sup>[6]</sup>。

**1.5 D-半乳糖皮下注射致脑老化小鼠模型** 可模拟 AD 的氧化损伤,小鼠出现学习记忆力下降、脑内胆碱能功能衰退,神经递质代谢异常、皮层和海马神经元损伤、超微结构和突触可塑性发生衰老性改变等。

## 2 检测指标

**2.1 行为学检测** Morris 水迷宫、穿梭箱实验、跳台实验、Y 型水迷宫、避暗实验等;此类实验用于检测动物的学习记忆能力。动物的学习记忆能力是与人的智能变化最为相关的指标,它和人的痴呆具有行为学的一致性,现已为世界众多学者广泛应用。

**2.2 细胞因子指标检测** 研究认为,通过刺激  $\beta$ -淀粉样前体蛋白的启动子上调淀粉样前体蛋白的表达。卢中朋等<sup>[7]</sup>研究表明用 AD 代谢产物 A $\beta$ 25-35 片段建立的 NG108-15 细胞 AD 模型是成功的,PNS 对 NG108-15 细胞 AD 模型的保护是有效的,而且能提高正常神经细胞的功能,为 PNS 在预防与治疗 AD 的有效性方面提供了有力证据。

## 2.3 病理组织形态学方面的观察

**2.3.1 神经递质含量的测定** 脑组织中的单胺神经递质 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NA)和多巴胺(DA)是维持正常职能的重要神经递质。AD 患者大脑皮层、海马、纹状体等部位 NE、额叶 5-HT 浓度、5-HT 受体数量及结合位点等均减少,因此提高脑内 DA、NE、5-HT 水平是药理学研究的又一方面<sup>[7]</sup>。

**2.3.2 神经电生理检测** 查运红等<sup>[8]</sup>利用双侧颈总动脉永久结扎(2VO)致脑低灌注与 D-半乳糖腹腔注射老化相结合的方法,建立一种新型的 AD 大鼠模型,结果显示 P300 潜伏期比正常组延长,认知功能明显下降。

**2.4 海马 NOSHup-A 神经元的表达** 现代神经生物学研究表明,NO 是正常学习和记忆的关键递质,它在 LTP 形成过程中可能起着信使的作用。用 NOS 抑制剂可阻断 CA1 区中 LTP 的形成。近年来的研究还表明,雌激素可促进 NO 的合成,具有抗氧化、抗兴奋性毒素,以及抑制  $\beta$ -淀粉样蛋白的神经毒性作用,通过调节胆碱能神经系统、神经营养因子或神经生长因子等保护神经元,并可能通过 NO 等来调节突触的可塑性<sup>[9]</sup>。

**2.5 生化指标观察** 研究认为自由基的毒副作用可以引起与痴呆及机体的衰老进程相关的机体组织,细胞的退行性变化能引起脂代谢异常而产生过多的脂褐素(LF)及丙二醛(MDA)等,从而损伤细胞膜等功能,并使 DNA 结构与功能破坏,最终造成组织细胞核器官的退行性变化,加速痴呆病程的发展<sup>[10]</sup>。

## 3 检测方法

**3.1 MTT 法** MTT 比色法检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚(Formazan),并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓚,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其吸光度值,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成的量与细胞数呈正比。卢中朋等<sup>[1]</sup>利用 MTT 法观察 PNS 对 NG108-15 细胞存活率的改变,结果证明 PNS 能增加 A $\beta$ 25-35 片段神经毒性诱导的 NG108-15 细胞存活率,具有减轻细胞对 A $\beta$  的神经毒性反应。该方法已经广泛用于一些生物活性因子的活性检测及细胞毒性实验的测定。

**3.2 免疫组化法** Lin 等<sup>[11]</sup>研究发现,胆碱能激动剂能活化毒蕈碱受体,刺激非淀粉样蛋白的产生,有助于 APP 的  $\alpha$  分泌途径降解,产生可溶性 APPS $\alpha$ 。结果表明,用毒蕈碱受体激动剂治疗能降低新大脑皮层和海马区细胞中 APP 的水平,同时脑脊液中 APPS $\alpha$  水平明显升高,即提高胆碱能的神经运输,有助于活体内 APP 的非淀粉样蛋白水解,对老年痴呆病症有明显效果。钟振国等<sup>[12]</sup>以 d-半乳糖腹腔注射致亚急性损伤合并鹅膏蕈氨酸(Ibotenic acid,BA)损毁双侧大脑 Meynert 基底核建立 AD 大鼠动物模型,利用免疫组织化学方法检测大脑 ChAT 免疫反应、Hup-A 神经元数量及形态学改变。研究结果表明,三七总皂苷 PNS 对 AD 大鼠动物模型大脑胆碱能神经元具有较强的保护作用,通过改善和修复受损神经元而提高细胞存活的数量和质量、提高 ChAT 的含量和活性,从而保护和改善中枢胆碱能系统的功能,发挥抗老化、抗痴呆的作用。有研究发现,bcl-2 mRNA 及 bcl-2 蛋白主要表达于病灶及病灶周围、大脑皮质额叶、顶叶、梨状区皮质、海马 CA1 至 CA4 区,给药组 Hup-A 细胞数量显著增加,细胞着色变深;将给药组与对照组 bcl-2 蛋白、bcl-2 mRNA 的病灶周围、皮层、海马处

Hup-A 细胞的面密度进行图像分析并统计,结果显示三七给药组较对照组 bcl-2 mRNA 及 bcl-2 的表达明显增高,说明 PNS 不仅用于 bcl-2 蛋白表达,而且同时影响其基因转录水平,通过增强抑凋亡基因的表达,减少神经细胞的凋亡。

### 3.3 行为学测试

**3.3.1 Morris 水迷宫** Morris 水迷宫是英国心理学家 Morris 于 1981 年设计并应用于脑学习记忆机制研究的一种实验手段,其在 AD 研究中的应用非常普遍。很多学者都采用此方法研究动物的空间学习记忆能力。在小鼠的学习行为中,水迷宫广泛运用于其视觉相关的空间记忆和工作记忆的测量中。罗小泉等<sup>[13]</sup>连续 4 d 对痴呆模型鼠进行水迷宫定位航行实验,每天训练 4 次,每次随机选择一个象限入水,再对每天不同入水象限、每天 4 次不同次序之间成绩进行比较分析。结果发现,第一次从远离目标的象限入水其成绩能更好地反映出模型鼠的记忆力。

**3.3.2 Y 型水迷宫** 侯德仁等<sup>[14]</sup>采用 Y 迷宫试验对大鼠的学习记忆能力进行测试。制模前和制模后 40 d 均予 Y 迷宫测试,按照模型鼠的“正确反应”,所需电击数代表学习记忆能力的差异,电击次数值越大,表示大鼠学习记忆能力越差。结果显示,中、高剂量何首乌能改善模型鼠的学习记忆能力。

**3.3.3 跳台实验** 用于测试各组模型鼠的学习记忆能力,记录每组模型鼠的错误次数和潜伏期。李兆圣等<sup>[15]</sup>运用亚甲蓝处理 3 个月龄至 7 个月龄的 APP/PS1 模型鼠海马结构 A $\beta$  及其相关蛋白表达的影响。模型鼠给予口服适量亚甲蓝,末次给药后 24 h,将三组模型鼠分别放入反应环境适应 3 min,然后通以 36 V 交流电,规定受电击后从起步区直接跳至安全区为“正确反应”,结果表明模型鼠各个时间段的平均潜伏期较对照组明显延长,错误次数增多;而给药组较模型组各个时间段的平均潜伏期明显缩短,错误次数减少,亚甲蓝能够改善 APP/PS1 模型鼠的学习记忆能力。

**3.4 聚合酶链反应(PCR)** 杨眉等<sup>[16]</sup>应用 PCR 方法从人基因组 DNA 中分离 NCT 基因编码区上游大小约为 1.8 kb 的片段,并以此为基础对启动子进行两端删除分析,分别扩增大小不等的片段,与 PGL3-Enhancer 荧光素酶报告基因载体质量组,通过瞬时转染 Hela 细胞,细胞裂解液进行双荧光素酶活性分析,分离 NCT 基因的启动子区。

## 4 结 语

目前采用的现代科技手段和方法,体外细胞模型和动物实验来阐述中药的药理作用是中药抗老年痴呆研究中的内容。利用 MTT 法,检测老年痴呆细胞模型的状态,选择药物造模,自然衰老老鼠模型等模拟老年痴呆的行为,病理和神经的变化,进而讨论药物制剂的作用和环节是当前研究老年痴呆的重要思路和方法。运用 PCR 方法,对影响老年痴呆的因素进行检测,使中药的相关作用机制研究得到深化,对神经生化特别是神经递质影响的研究,使中医药抗痴呆机制研究跃上了一个新的台阶。老年痴呆的中医研究虽然起步较晚,但其存在自身的优势,作者相信,以传统中医理论借助现代科技手段,合理利用丰富中药资源,在中药防治老年痴呆的研究领域内定能取得辉煌。

## 参考文献

[1] 卢中朋,王乃平,钟振国.三七总皂苷对 A $\beta$ 25-35 诱导的

NG108-15 细胞损伤的保护作用[J]. 中医药学刊,2004,22(5):872-878.

[2] 张均田,张庆柱.神经药理学研究技术与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:320.

[3] 许盈,刘荣芳,徐剑文,等.冈田酸诱导 NG108-15 细胞 tau 蛋白过度磷酸化过程中 PTEN 蛋白水平的变化[J].海峡药学,2007,19(10):15.

[4] 钟振国,赖世隆,刘茂才,等.补肾益智方对 AD 模型影响的研究[J].现代中国中西医结合杂志,2002,22(1):50-53.

[5] 夏若寒,刘声远,王建枝.抑制蛋白磷酸酶对嗜铬细胞瘤细胞一氧化氮合酶活性的影响[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2001,10(1):14-17.

[6] Kuo H, Ingram DK, Walker LC, et al. Similarities in the age-related hippocampal deposition of periodic acid-schiff-positive granules in the senescence-accelerated mouse P8 and C57BL/6 mouse strains[J]. Neuroscience, 1996, 74(3):733-740.

[7] 郭青龙,陈真,谢林,等.神乐康对大鼠脑内单胺类神经递质及其代谢产物的影响[J].中国药科大学学报,1999,30(5):377-379.

[8] 查运红,梅元武,黄敬.一种新的老年期痴呆大鼠模型的研究[J].微循环学杂志,2007,17(3):13-15.

[9] Manthey D, Behl C. From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen[J]. Neuroscience, 2006, 138(3):845-850.

[10] 任志丽,陈东辉.老年痴呆的相关实验性检测指标分析[J].检验医学与临床,2009,6(10):803-804.

[11] Lin L, Georgievskia B, Mattsson A, et al. Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in the cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(21):12108-12113.

[12] 钟振国,屈泽强,王乃平,等.三七总皂苷对 Alzheimer's 病大鼠模型大脑胆碱能神经病理损害的保护作用[J].中药材,2005,28(2):119-122.

[13] 罗小泉,骆利平,陈海芳,等. Morris 水迷宫检测大鼠记忆力方法的探讨[J].时珍国医国药,2010,21(10):2667-2669.

[14] 侯德仁,杨期东,周琳,等.何首乌对 Alzheimer 病模型大鼠学习记忆的影响及其机制的研究[J].中国医师杂志,2004,6(3):347-349.

[15] 李兆圣,赖红,赵海花,等.亚甲蓝对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区树突棘密度的保护作用[J].中国老年学杂志,2012,32(19):4189-4190.

[16] 杨眉,蔡芳,王瑞山,等.阿尔兹海默病相关基因 nicastrin 启动子的克隆和鉴定[J].中南大学学报:医学版,2006,31(1):9-13.

(收稿日期:2012-09-14 修回日期:2012-12-19)