

鞘内注射三氯化铝建立阿尔茨海默病大鼠模型

马 龙*, 杨 勇, 周晓辉, 洪 玉

(新疆医科大学公共卫生学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要:目的 探讨鞘内注射 AlCl_3 建立阿尔茨海默病(AD)大鼠模型的可行性。方法 手术显微镜下行大鼠蛛网膜下腔插管并留置 5 d。大鼠鞘内注射 1.5% AlCl_3 40 μL , 每日 1 次, 连续 5 d。最后 1 次给 AlCl_3 后 28 d 进行避暗及跳台行为学实验; 取脑皮质和海马, 切片, HE 染色观察颗粒空泡变性变化和锥细胞计数, Bielschowsky 染色观察神经原纤维缠结, 免疫组化染色观察淀粉样 β 蛋白($\text{A}\beta$)、淀粉样 β 蛋白前体($\beta\text{-APP}$)和 tau 蛋白阳性细胞数量。结果 大鼠鞘内注射 AlCl_3 后避暗及跳台实验错误次数明显增加, 潜伏期明显缩短。海马颗粒空泡变性细胞明显增多, 海马和皮质锥体细胞明显减少。大脑皮质和海马 $\text{A}\beta$, $\beta\text{-APP}$ 和 tau 免疫阳性神经细胞数量明显增多。可见神经原纤维缠结样病理改变和 $\text{A}\beta$ 沉积。结论 鞘内注射 AlCl_3 建立 AD 大鼠模型方法简便、实用并能较好地模拟 AD 行为和病理表现。

关键词: 阿尔茨海默病; 铝; D-半乳糖; 模型, 动物; 鞘内注射

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2006)05-0426-07

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是不可逆转的渐进性发展的脑疾病, 目前无特效的治疗方法, 其病因及发病机制至今尚未明确。根据不同的 AD 发病机制假说, 国内外学者建立了多种 AD 动物模型, 对于 AD 病因、病理学及治疗学的研究至关重要。目前转基因模型能较好的模拟 AD 某些特征性病理改变, 但价格昂贵, 制约了 AD 的基础研究。铝金属中毒可能是 AD 病因之一, 给猫脑内注射铝可出现某些记忆缺失和 AD 特征性病理改变^[1]。

国内学者以脑室内埋管注入 AlCl_3 制成小鼠 AD 模型, 小鼠出现明显的学习记忆障碍和 AD 病理改变^[2]。本实验选择鞘内注射铝盐建立 AD 模型, 以期寻找一种既能较全面地模拟人类 AD 表现, 又具有简便实用、可重复性和稳定性等特点的模型制备方法, 为 AD 基础研究的深入, AD 治疗药物的筛选提供有力支持。

1 材料和方法

1.1 仪器装置和试剂

避暗仪、跳台仪(中国医学科学院药物研究所生产), 手术显微镜(德国 Brainlab 公司, MC-1 型)。 AlCl_3 (上海试剂二厂生产)。单克隆小鼠 tau 抗体, 多克隆兔抗 $\beta\text{-APP}/\text{A}\beta_{1-40}$ 抗体, SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德公司)。DAB(Dako 公司)。以上试剂均为分析纯。

1.2 AlCl_3 鞘内注射法建立 AD 动物模型

SD 雄性大鼠, 体重 280 ~ 330 g(新疆医科大学实验动物中心提供), 单笼饲养。采用 Yaksh 等^[3, 4]法于手术显微镜下行蛛网膜下腔插管, 插管留置于蛛网膜下腔内 5 d 后拔除。大鼠随机分 3 组, 生理盐水(NS)组和 AlCl_3 组分别鞘内注射(it) NS 和 1.5% AlCl_3 40 μL , 每日 1 次, 连续 5 d。正常对照组不作处理。最后 1 次给 AlCl_3 后 28 d 进行行为学实验及病理检验。

1.3 腹腔注射法建立 AD 动物模型^[5]

SD 雄性大鼠, 体重 280 ~ 330 g, 经行为学实验筛选, 去除反应不敏感的大鼠, 将符合要求的大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为 2 组, 分别每日 ip AlCl_3 65.7 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + D-半乳糖 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和等量 NS, 连续 60 d。

1.4 避暗及跳台实验^[6]

避暗回避实验: 长 60 cm, 宽 25 cm, 高 30 cm 有机玻璃避暗回避实验箱, 分明暗两室, 两室间有一直径 8 cm 的圆孔, 室底均布有可通电的铜栅。利用大

收稿日期: 2005-08-31 接受日期: 2006-03-22

作者简介: 马 龙, 47 岁, 男, 教授, 博士生导师。

*联系作者 Tel: (0991)4362204 13899871425

鼠喜暗的习性,将大鼠背对暗室的洞口放入明室,并开始计时,大鼠很快进入暗室,此时接通暗室电源,给予 40V 直流电击大鼠 1 s,其会逃出暗室。如此训练 5 min,24 h 后再测。记录大鼠从放入明室到进入暗室遭电击的时间为潜伏期,并记录 5 min 内大鼠受电击的次数为错误次数。

跳台实验:跳台仪为长宽高均为 30 cm 的有机玻璃箱,底部铺设铜栅作为刺激电极,内置一高 7.0 cm、直径 7.0 cm 的橡皮垫安全台可供大鼠回避电击用。先将大鼠放置安全台上让其自动下台 3 次,第 4 次跳下平台即施予 40 V 电击,受到电击后,其会重新跳到平台上躲避刺激,多数大鼠会再次跳至铜栅,受电击后又跳上平台。如此训练 5 min,24 h 后记录大鼠第一次跳下平台的时间及 5 min 内跳下平台的次数,分别作为潜伏期和错误次数。

1.5 病理观察和免疫组化染色

行为实验结束后处死大鼠,断头取左侧大脑皮质和海马,10% 甲醛固定,常规石蜡切片,切片厚度 3~5 μm 。每个标本取切片 9 张(包括皮质和海马),其中 5 张常规 HE 染色,观察颗粒空泡变性变化和锥体细胞计数。1 张 Bielschowsky 染色,观察神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles)。3 张免疫组化染色,42℃ 烤片过夜。用免疫组化 ABC 法进行淀粉样 β 蛋白(amyloid β -protein, A β)、淀粉样 β 蛋白前体(amyloid β -protein precursor, β -APP)和微管相

关 tau 蛋白染色,观察 A β 、 β -APP 和 tau 阳性细胞表达。在相同脑区(海马 CA1 区,顶叶皮质)400 倍镜下各选取相邻 3 个视野,每个视野内计数免疫阳性细胞数,取均值。

应用麦克奥迪病理显微镜图像分析系统(CMIAS 型, Motic China, 中国)对切片进行图像分析。观察颗粒空泡变性细胞计数及免疫组化染色阳性细胞计数,计数的同一区域组织块三维定位相同。

1.6 统计学处理

结果数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用 SPSS12.0 统计软件包行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 鞘内及腹腔注射 AlCl_3 对大鼠学习记忆能力的影响

大鼠每天鞘内注射 1.5% AlCl_3 40 μL ,连续 5 d,最后 1 次注射后 28 d 进行避暗实验和跳台实验。结果可见, AlCl_3 组大鼠较正常对照组和 NS 对照组大鼠错误次数明显增多,潜伏期明显缩短。腹腔注射 AlCl_3 + D -半乳糖 60 d,在跳台和避暗实验中也见模型组大鼠的错误次数较对照组大鼠明显增多,潜伏期明显缩短。说明鞘内注射 AlCl_3 5 d 和腹腔注射 AlCl_3 + D -半乳糖 60 d 均可引起大鼠学习记忆损害。

Tab 1. Effect of AlCl_3 given intrathecally (5 d) or intraperitoneally (60 d) on passive avoidance condition responses in rats

Group	<i>n</i>	Step-down test		Step-through test	
		Latency/s	Number of errors with 5 min	Latency/s	Number of errors with 5 min
Normal	6	238 \pm 60	0.8 \pm 0.8	273 \pm 14	0.5 \pm 0.5
NS	it 6	265 \pm 52	0.5 \pm 0.5	287 \pm 25	0.3 \pm 0.5
AlCl_3	it 6	34 \pm 31 *	2.7 \pm 1.2 *	70 \pm 15 *	2.7 \pm 0.5 *
NS	it 6	239 \pm 79	0.8 \pm 0.7	233 \pm 65	0.8 \pm 0.4
AlCl_3	it 6	8 \pm 11 *	2.7 \pm 1.0 *	55 \pm 43 *	2.5 \pm 0.9 *
NS	ip 11	245 \pm 50	0.7 \pm 0.5	272 \pm 38	0.5 \pm 0.5
AlCl_3 + D -Gal	ip 7	102 \pm 60 *	2.0 \pm 1.0 *	108 \pm 44 *	2.0 \pm 0.6 *

In intrathecal injection (it) groups, normal saline (NS) or 1.5% AlCl_3 40 μL per rat was given once daily for 5 d. Step-down and step-through tests were examined on d 28 after the last injection. In intraperitoneal injection (ip) groups, AlCl_3 65.7 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ + D -galactose (Gal) 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ were given once daily for 60 d. Step-down and step-through tests were examined 24 h after the last injection. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, compared with corresponding NS groups.

2.2 鞘内及腹腔注射 AlCl_3 对大鼠脑皮质和海马神经元的影响

计数海马 300 个细胞,可见 AlCl_3 (it)组颗粒空泡变性细胞较对照组明显增多(表 2)。光镜下见变性细胞胞质淡染,呈明显网状或空泡样(图 1)。表明铝可使海马神经细胞发生颗粒空泡变性。海马和皮质锥体细胞也明显减少,尤以皮质锥体细胞的减少更为明显。说明铝中毒可使脑神经元细胞数目减少。腹腔注射 AlCl_3 + *D*-半乳糖也引起大鼠脑神经元减少和海马颗粒空泡变性细胞增多,但程度轻于鞘内给铝。

银染色病理观察清楚可见神经原纤维缠结。多见于较大的神经元,尤以海马、杏仁核、颞叶内侧和额叶皮质的锥体细胞最为多见。形态特点是缠结变性的神经原纤维变粗或粗细不等,排列紊乱呈密集的团块状或纺织状遍布于胞质内(图 2)。

2.3 鞘内及腹腔注射 AlCl_3 对大鼠脑皮质和海马 $\text{A}\beta$, β -APP 及 tau 免疫阳性神经元计数的影响

结果可见,鞘内注射 AlCl_3 5 d,大脑顶叶皮质和海马 CA1 区 $\text{A}\beta$, β -APP 和 tau 阳性神经元计数较对照组明显增多(表 3)。 $\text{A}\beta$ 免疫反应阳性产物在光镜下呈棕黄色颗粒状(图 3 A, B, C),多呈梭形和锥体形,位于神经元核周质、突起以及分叉处,细胞核

呈阴性反应。主要集中分布于皮质、海马齿状回和 CA1 区,大脑皮层以锥体细胞为主,胞浆阳性着色,间质内亦可见散在分布不均的阳性着色颗粒。在血管壁上也有较多的 $\text{A}\beta$ 沉积。 β -APP-Li 神经元,其阳性反应物为棕黄色(图 3 D, E, F),分布于胞膜及胞浆,多呈戒指环状、梭形和锥体形。tau 阳性神经元显色在海马锥体神经元细胞核周区较集中(图 3 G, H, I),对照组主要散布于胞质中。连续腹腔注射 *D*-半乳糖 + AlCl_3 60 d,亦可见实验组大脑顶叶皮质和海马 CA1 区 $\text{A}\beta$, β -APP 阳性神经元及海马 tau 阳性神经元较对照组增多。

3 讨论

老年斑、脑内淀粉样蛋白沉积、神经原纤维缠结、区域性神经细胞死亡和颗粒空泡变性等是 AD 的病理特征,前二者的主要成分为 $\text{A}\beta$,其他也被证实具有 $\text{A}\beta$ 的特性或与其有关^[7-9]。因此可以说脑内出现大量的 $\text{A}\beta$ 沉积是 AD 的早期和必要的神经病理学特征^[10]。 $\text{A}\beta$ 不仅是 AD 患者脑内老年斑的主要结构物质,也参与神经原纤维缠结的形成,而且它的毒性作用是 AD 病理机制中的重要

Tab 2. Effect of AlCl_3 given intrathecally (5 d) or intraperitoneally (60 d) on granulovacuolar degeneration (GVD) and number of pyramidal neurons in hippocampus and cortex of rats

Group	<i>n</i>	GVD in hippocampus		Number of pyramidal neurons	
		Number of GVD	Rate of GVD/%	Hippocampus	Cortex
Normal	6	1.95 ± 0.37	0.65	117.5 ± 1.7	60.9 ± 3.5
NS	it 6	1.87 ± 0.16	0.62	123.3 ± 4.5	69.5 ± 3.5
AlCl_3	it 6	5.53 ± 0.27 *	1.84	102.0 ± 4.1 *	36.5 ± 2.0 *
NS	it 6	2.20 ± 0.25	0.73	127.1 ± 3.5	63.2 ± 3.9
AlCl_3	it 6	5.50 ± 0.52 *	1.83	104.0 ± 1.7 *	33.3 ± 2.2 *
NS	it 6	1.6 ± 0.4	0.53		
AlCl_3	it 7	3.5 ± 0.6 *	1.17		
NS	ip 11	2.0 ± 0.3	0.68	125.0 ± 4.0	62.0 ± 3.0
AlCl_3 + <i>D</i> -Gal	ip 7	2.7 ± 0.3 *	0.91	112.4 ± 2.5 *	52.2 ± 0.8 *

See legend of Tab 1 for rat treatments. Neurons were counted on d 28 after the last it injection or on d 4 after the last ip injection. GVD number was counted from 300 hippocampal neurons in 1 slice, mean from 5 slices in one rat. Number of pyramidal neurons was counted in one slice, mean from total 5 slices in every rat's cortex and hippocampus. $\bar{x} \pm s$, *n* = number of rats tested. * *P* < 0.05, compared with corresponding NS groups.

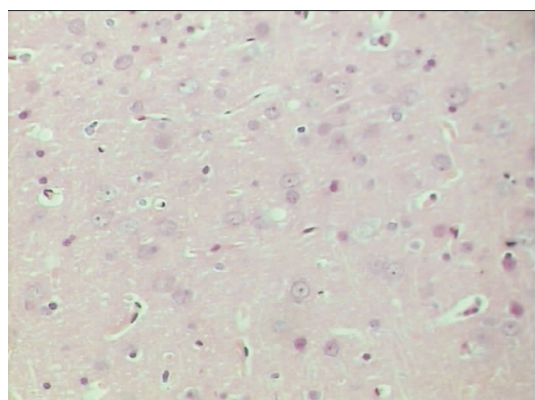


Fig 1. Photograph of granulovacuolar degeneration in hippocampus of rat on d 28 after 1.5% AlCl_3 intrathecal injection for 5 d. See legend of Tab 1 and Tab 2 for experimental protocol. The number of GVD cells increased significantly. And cytoplasmic shrinkage, swelling, nuclear pyknosis, and dislocation were showed. (HE, $\times 400$)

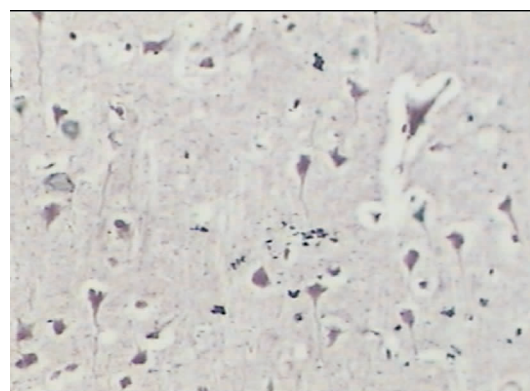


Fig 2. Photograph of neurofibrillary tangles (NFT) in hippocampus of rat on d 28 after 1.5% AlCl_3 intrathecal injection for 5 d. See legend of Tab 1 and Tab 2 for experimental protocol. In the photograph, fused, disordered and thickened neurofibrils, still a few NFT were found. (Silver staining, $\times 400$)

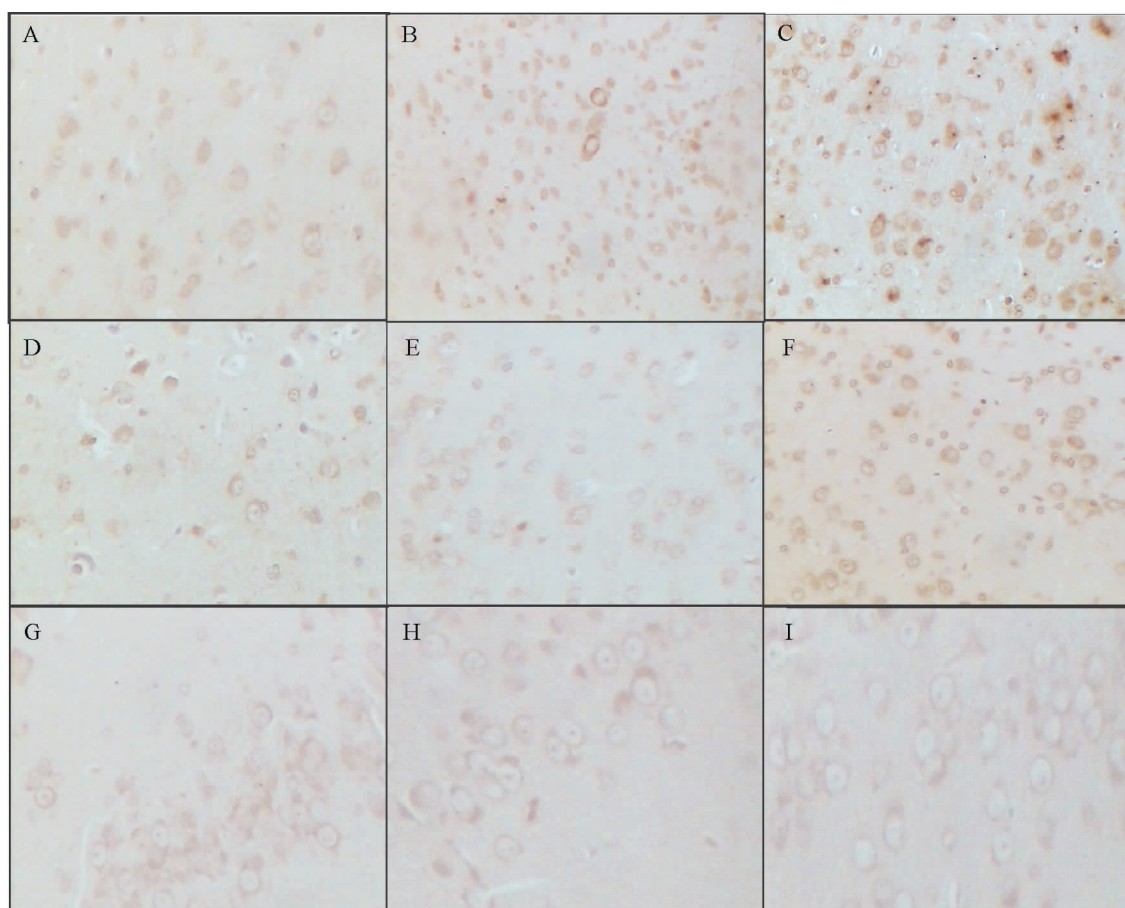


Fig 3. Amyloid β -protein ($\text{A}\beta$), amyloid β -protein precursor ($\beta\text{-APP}$) and tau protein immunohistochemical positive cells in hippocampus of rat on d 28 after 1.5% AlCl_3 intrathecal injection for 5 d. A, B, C: $\text{A}\beta$ positive cells; D, E, F: $\beta\text{-APP}$ positive cells, G, H, I: tau positive cells. A, D, G: corresponding control groups; B, E, H: corresponding NS groups, C, F, I: corresponding AlCl_3 groups. More $\text{A}\beta$ -, $\beta\text{-APP}$ -, and tau-positive immunoreactive neurocytes were found in hippocampal formation in AlCl_3 groups than that in the corresponding control groups. (ABC immunocytochemical method, $\times 400$)

Tab 3. Effect of AlCl₃ given intrathecally (5 d) or intraperitoneally (60 d) on A β , β -APP and tau immunohistochemical positive cells in hippocampus and cortex of rats

Group	<i>n</i>	A β positive cell		β -APP positive cell		Tau positive cell	
		Cortex	Hippocampus	Cortex	Hippocampus	Cortex	Hippocampus
Normal	6	12.2 \pm 1.6	11.8 \pm 1.1	12.0 \pm 0.5	12.9 \pm 0.7	9.7 \pm 1.7	12.6 \pm 1.1
NS	it 6	12.3 \pm 1.4	13.5 \pm 1.2	12.3 \pm 0.6	12.1 \pm 0.9	8.0 \pm 1.1	11.3 \pm 1.1
AlCl ₃	it 6	20.0 \pm 1.4 *	28.7 \pm 1.0 *	25.3 \pm 1.9 *	25.0 \pm 2.6 *	14.1 \pm 1.8 *	18.7 \pm 2.3 *
NS	it 6	12.9 \pm 1.1	14.6 \pm 1.5	14.5 \pm 1.0	12.9 \pm 1.0	9.7 \pm 1.1	11.8 \pm 1.0
AlCl ₃	it 6	23.6 \pm 3.3 *	30.0 \pm 2.0 *	24.9 \pm 1.5 *	23.0 \pm 1.8 *	14.7 \pm 1.1 *	21.4 \pm 1.8 *
NS	it 6	12.6 \pm 1.4	13.6 \pm 1.5	13.8 \pm 0.5	12.8 \pm 0.7	8.9 \pm 1.3	12.6 \pm 1.2
AlCl ₃	it 7	24.1 \pm 1.0 *	27.5 \pm 2.0 *	23.0 \pm 1.5 *	25.3 \pm 1.6 *	14.1 \pm 1.4 *	22.8 \pm 1.0 *
NS	ip 11	13.7 \pm 0.9	12.9 \pm 0.9	12.8 \pm 0.8	13.8 \pm 0.9	10.8 \pm 0.9	13.3 \pm 0.8
AlCl ₃ + D-Gal	ip 7	18.8 \pm 2.3 *	16.0 \pm 1.3 *	15.5 \pm 1.4 *	14.5 \pm 0.4	12.7 \pm 0.8 *	12.8 \pm 1.0

See legend of Tab 1 for rat treatments. Immunohistochemical positive cells were counted on d 28 after the last intrathecal injection or on d 4 after the last ip injection. Data were expressed as mean of 3 views ($\times 400$) in 1 slice of one rat. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, compared with corresponding NS groups.

环节。A β 的神经毒性已得到体外实验的广泛证实^[11]。近年来关于 APP 对 AD 影响的研究报道甚多。A β 由 APP 水解产生,是 β -APP 的异常病理性裂解产物。 β -APP 广泛分布于正常脑组织中,不仅参与正常的生理活动,同时也参与异常病理过程。APP 表达的改变对于 A β 沉积的形成及 AD 的发病机制起着重要作用^[12]。大部分学者认为 APP 基因过表达是 A β 沉积的原因。神经细胞内的神经原纤维缠结是 AD 特征性脑损伤之一。多见于较大的神经元,尤以海马、杏仁核、颞叶内侧和额叶皮质的锥体细胞最为多见。形态特点是缠结变性的神经原纤维变粗或粗细不等,排列紊乱呈密集的团块状或编织状遍布于胞质内。这一变化是神经元趋向死亡的标志。AD 的痴呆程度与双链原纤维丝 (paired helical filaments, PHF) 组成的神经原纤维缠结的多少成正比。PHF 是神经原纤维缠结的主要组成纤维,具有独特的形态。蛋白化学和分子克隆直接说明了 tau 蛋白是构成 PHF 唯一必需的成分。Tau 异常高度磷酸化后在胞内聚积形成 PHF,是 AD 神经元退化的较早病理特征之一。有报道 AD 患者脑中微管相关蛋白 tau 的含量显著高于对照者。在 AD 的特征性病理学改变中,颗粒空泡变性被认为是更具“专一性”的组织学标志,海马神经细胞颗粒空泡变

性细胞阳性率达 9% 即对 AD 有诊断意义。

铝是一种神经毒性元素,动物实验及流行病学调查均证实了铝可引起学习记忆及认知能力障碍。流行病学资料研究发现,AD 患者大脑皮质中铝的含量明显升高,Okamoto 等^[13]在 AD 的颗粒空泡中发现铝元素蓄积,铝在脑内沉积位置与老年斑中心相一致,而且检测出淀粉样沉积中含有铝,铝可能参与老年斑和神经原纤维缠结形成的早期阶段。给猫、兔及鼠注射或服用铝盐后,可致显著的学习记忆障碍,并出现神经原纤维变性和神经原纤维缠结等 AD 特征性病理变化,而且神经原纤维缠结中心亦有铝的沉积^[14],铝的神经毒性机制也涉及到胆碱能系统。已有研究证实铝可造成中枢胆碱能功能低下,导致学习记忆能力下降。铝在脑内的异常蓄积可引起 β -APP 过度表达,引起 A β 的产生和沉积。上述结果提示,利用铝引起的学习记忆功能障碍是 AD 较为理想的模型之一^[15]。利用铝制备 AD 动物模型方法很多,多以胃肠道、腹腔注射及脑室注射为造模途径。应用胃肠道或腹腔注射的方法建立模型,实验期过长(腹腔注射需 60 d;灌胃需 90 d),操作强度大、费用昂贵、影响因素复杂、成功率低、敏感性、重复性差,最重要的是难以出现 AD 特征病理改变,尤其是神经原纤维缠结。另外有学者应用各种

物理或化学方法破坏或降低投射到大脑皮质的胆碱能投射系统的功能状态而引起学习记忆障碍^[16]的方法建立的 AD 动物模型, 虽能模拟 AD 的学习记忆障碍, 但他们引起的脑病理改变与 AD 的病理改变相距甚远。用转基因方法能建立理想的 AD 动物模型^[17], 但该法动物数量少, 成本昂贵, 很难用于广泛研究。

应用鞘内注射途径制备大鼠 AD 模型的方法国内外尚未见报道。本实验首先经预实验进行鞘内注射 AlCl_3 剂量 (0.5%, 1.0%, 1.5%) 和采样时间 (7, 14, 28 d) 的选择, 得出较为理想的 AlCl_3 浓度为 1.5% 和取脑时间为给铝后 28 d。以最佳条件复制 AD 大鼠模型, 出现神经原纤维缠结及 $\text{A}\beta$ 广泛沉积等与 AD 相似的病理特征。本实验同时以腹腔注射 D-半乳糖 + AlCl_3 60 d 建立 AD 大鼠模型, 虽然在行为学及脑特征蛋白表达方面与 AD 有相似性, 但未发现神经原纤维缠结, $\text{A}\beta$ 沉积亦较少。而且造模时间长, 给铝量大, 敏感性差, 实验干扰因素复杂。大量大鼠出现腹水, 死亡率明显升高 (死亡率高达 41.7%, 而鞘内注射死亡率仅为 6.3%)。

本方法制备的模型在病理改变上较接近 AD, 能复制神经原纤维缠结是其优点。经 3 次实验均成功复制出 AD 模型, 说明本方法的可靠性、敏感性和可重复性。同时需时短, 影响因素易于控制, 减少了个体差异, 副作用小, 避免了腹腔注射引起腹水死亡及肝、肾、巩膜等铝超载干扰因素对实验的影响。与脑室置管注射相比具有不损伤脑组织, 避免了脑室置管引起的脑组织水肿以及异物刺激引起脑组织感染, 死亡率明显降低。而且操作方便, 适宜长时给药 (最长可达 46 d), 大剂量给药 (20 ~ 50 μL , 脑室注射 3 ~ 5 μL)。另外采用显微外科手术操作损伤小, 置管成功率高 (94%), 节省了动物, 降低了实验成本。但该方法操作要求技术含量高, 需要进行显微外科操作技术培训, 而且并没有复制出老年斑这一病理特征。如何形成具有更全面 AD 特征病理改变的模型仍需进一步探索。

4 参考文献:

- [1] Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration [J]. *Science*, 1973, **180** (85):511-513.
- [2] Li L, Chen RZ. Effect of intracerebroventricular injections of AlCl_3 on the passive avoidance condition responses in mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1999, **13** (4):260-263.
- [3] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space [J]. *Physiol Behav*, 1976, **17** (6):1031-1036.
- [4] Vanderah TW, Laughlin T, Lashbrook JM, Nichols ML, Wilcox GL, Ossipov MH, *et al*. Single intrathecal injections of dynorphin A or des-Tyr-dynorphins produce long-lasting allodynia in rats: blockade by MK-801 but not naloxone [J]. *Pain*, 1996, **68** (2-3):275-281.
- [5] Sun XF, Liu ZP, Zhang XP, Zhang ZX. Effects of aluminum on the number of neurons granulovacuolar degeneration in rats [J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 1999, **28** (3):164-166.
- [6] Hu HT, Qian YH, Yang J, Zhang ZJ, Wang WX, Fang XY. Expression of amyloid precursor protein in dorsal hippocampal formation of dementia model in rat [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1997, **20** (5):444-446.
- [7] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis [J]. *Science*, 1992, **256** (5054):184-185.
- [8] Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (2):567-571.
- [9] Forloni G, Bugiani O, Tagliavini F, Salmona M. Apoptosis-mediated neurotoxicity induced by beta-amyloid and PrP fragments [J]. *Mol Chem Neuropathol*, 1996, **28** (1-3):163-171.
- [10] Watson DJ, Lander AD, Selkoe DJ. Heparin-binding properties of the amyloidogenic peptides Abeta and amylin. Dependence on aggregation state and inhibition by Congo red [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272** (50):31617-31624.
- [11] Forloni G, Tagliavini F, Bugiani O, Salmona M. Amyloid in Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies: studies with synthetic peptides [J]. *Prog Neurobiol*, 1996, **49** (4):287-315.
- [12] Clarris HJ, Key B, Beyreuther K, Masters CL, Small DH. Expression of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the developing rat of factory system [J]. *Dev Brain Res*, 1995, **88** (1):87-95.
- [13] Okamoto K, Hirai S, Lizuka T, Yanagisawa T, Watanabe M. Reexamination of granulovacuolar degeneration

- [J]. *Acta Neuropathol* (Berl), 1991, **82**(5):340 – 345.
- [14] Florence AL, Gauthier A, Ponsar C, Van den Bosch de Aguilar P, Crichton RR. An experimental animal model of aluminium overload[J]. *Neurodegeneration*, 1994, **3**(4):315 – 323.
- [15] Yokel RA. Aluminum produces age related behavioral toxicity in the rabbit[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1989, **11**(3):237 – 242.
- [16] Smith G. Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation[J]. *Brain Res*, 1988, **472**(2):103 – 118.
- [17] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Yonkin S, *et al.* Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice [J]. *Science*, 1996, **274**(5284):99 – 102.

Establishment of Alzheimer's disease rat model by intrathecal injection with aluminum chloride

MA Long*, YANG Yong, ZHOU Xiao-Hui, HONG Yu

(College of Public Health, Xingjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: **AIM** To study the feasibility of establishing Alzheimer's disease (AD) rat model with aluminum chloride by intrathecal injection. **METHODS** Canula was inserted into subarachnoid cavity of rats by microsurgery for administration of aluminum chloride (1.5%) 40 μ L, once a day for 5 d, then pulling out the canula. The passive avoidance condition responses were tested, the expressions of amyloid β -protein (A β), amyloid β -protein precursor (β -APP), tau protein (ABC immunocytochemical methods), neurofibrillary tangles (Bielschowsky method) and granulovacuolar degeneration and number of pyramidal neurons (HE staining) in cerebral cortex and hippocampi were examined. **RESULTS** On d 28 after the last aluminum chloride injection, latencies in step-down and step-through tests de-

creased and number of error increased; A β , β -APP and tau immunohistochemical positive cells increased, and pyramidal neurons lost in cerebral cortex and hippocampi; granulovacuolar degeneration was seen in hippocampus; especially neurofibrillary tangles formed in neurons. **CONCLUSION** AD rat model can be established with aluminum chloride (1.5%) intrathecal injection, which represents behavior characterizations and some of pathological manifestations in AD.

Key words: Alzheimer's disease; aluminum; D-galactose; models, animal; intrathecal injection

* Corresponding author.