

# 认知功能障碍大鼠脑神经型烟碱乙酰胆碱受体显像研究

姜玉艳,刁 尧,尹雅芙,黄乐乐,莫业雄,张大龙,李亚明

(中国医科大学附属第一医院 核医学科,辽宁 沈阳 110001)

**摘要:**采用双侧颈总动脉结扎法建立大鼠慢性脑缺血模型,4周后经 Morris 水迷宫实验验证认知功能障碍,经尾静脉注射神经型烟碱乙酰胆碱受体(nAChRs)显像剂  $2\text{-}^{[18}\text{F}]\text{-A-85380}$  后 30、60、120、180、240 min,用 Micro-PET 各扫描一次,每次持续 10 min。选取丘脑、额皮质、小脑为鼠脑感兴趣区,以  $\text{SUV}_{\text{ave丘脑}}/\text{SUV}_{\text{ave小脑}}$ 、 $\text{SUV}_{\text{ave额皮质}}/\text{SUV}_{\text{ave小脑}}$  放射性摄取比为慢性缺血组与正常组的比较参数。经正常组大鼠扫描后,慢性脑缺血认知障碍大鼠选择在 120 min 行  $2\text{-}^{[18}\text{F}]\text{-A-85380}$  Micro-PET 脑部扫描 10 min。结果表明,Morris 定向航行实验中两组大鼠逃避潜伏期随实验天数增加而缩短,在第 5 d 时正常组为  $(9.44 \pm 5.48)$  s,慢性缺血组为  $(24.16 \pm 27.18)$  s,差异有统计学意义,慢性缺血组大鼠在学习寻找平台上较正常组缓慢;Morris 空间探索实验,撤掉平台后,慢性缺血鼠按之前学习寻找平台的轨迹,穿过原来放置平台的象限次数较正常组少,慢性缺血组为  $(2.60 \pm 1.67)$  次,正常组为  $(6.20 \pm 2.95)$  次,差异有统计学意义;正常大鼠脑部 Micro-PET 显像,在 120 min 时,可清晰显示丘脑、小脑及额皮质结构,且持续至 240 min,其  $\text{SUV}_{\text{ave丘脑}}/\text{SUV}_{\text{ave小脑}}$ 、 $\text{SUV}_{\text{ave额皮质}}/\text{SUV}_{\text{ave小脑}}$  放射性摄取比在 120 min 时分别为  $1.62 \pm 0.06$ 、 $1.34 \pm 0.28$ ,认知功能障碍大鼠  $\text{SUV}_{\text{ave丘脑}}/\text{SUV}_{\text{ave小脑}}$ 、 $\text{SUV}_{\text{ave额皮质}}/\text{SUV}_{\text{ave小脑}}$  放射性摄取比分别为  $1.27 \pm 0.02$ 、 $1.07 \pm 0.03$ ,差异有统计学意义。通过对缺血大鼠进行  $2\text{-}^{[18}\text{F}]\text{-A-85380}$  Micro-PET 脑显像发现, $2\text{-}^{[18}\text{F}]\text{-A-85380}$  在慢性缺血大鼠与正常大鼠的丘脑相比摄取降低,缺血组  $\text{SUV}_{\text{ave丘脑}}/\text{SUV}_{\text{ave小脑}}$ 、 $\text{SUV}_{\text{ave额皮质}}/\text{SUV}_{\text{ave小脑}}$  较正常组显著降低,说明缺血后认知功能障碍与烟碱乙酰胆碱受体减少有关。缺血后认知功能障碍大鼠能在出现运动症状前出现受体数量降低或  $2\text{-}^{[18}\text{F}]\text{-A-85380}$  与受体结合率降低,通过 nAChRs 受体显像可在慢性缺血后已出现认知障碍的患者中发现其受体早期变化,从而给予早期干预治疗,改善预后。

**关键词:**  $2\text{-}^{[18}\text{F}]\text{-A-85380}$ ; 缺血; 认知功能障碍; nAChRs; Micro-PET; 定量分析

**中图分类号:** TL92+3; R817.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-7512(2017)02-0110-09

**doi:** 10.7538/tws.2017.30.02.0110

## The Quantitative Analysis of $2\text{-}^{[18}\text{F}]\text{-A-85380}$ nAChRs Micro-PET Brain Imaging in Chronic Ischemic Rats with Cognitive Dysfunction in Vivo

JIANG Yu-yan, DIAO Yao, YIN Ya-fu, HUANG Le-le, MO Ye-xiong, ZHANG Da-long, LI Ya-ming  
(Department of Nuclear Medicine, The First Hospital of China Medical University, Shen Yang, 110001, China)

**Abstract:** The change of  $2\text{-}^{[18}\text{F}]\text{-A-85380}$  in chronic ischemia rats with cognitive dys-

收稿日期:2016-12-06;修回日期:2017-01-10

基金项目:国家自然科学基金(81000623,81671717);辽宁省科学技术计划项目(2013225049)

作者简介:姜玉艳(1988—),女,天津人,住院医师,主要从事神经受体显像研究

通信作者:尹雅芙,教授, E-mail: yinyf-2001@163.com

function was evaluated by Micro-PET. Chronic cerebral ischemia rat model was made by bilateral common carotid artery ligation. Four weeks later, Morris water experiments were performed to check cognitive dysfunction. After intravenous injection of 37 MBq 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380, the normal isoflurane-anesthetized rat underwent Micro-PET scan. The brain scanning was performed for 10 minutes at 30, 60, 120, 180, 240 minutes after injection. Select the thalamus, frontal cortex, cerebellum as region of interesting for quantitative analysis. The chronic ischemia rats underwent Micro-PET scan for 10 minutes at 120 minutes.  $SUV_{ave\ thalamus}/SUV_{ave\ cerebellum}$ ,  $SUV_{ave\ frontal\ cortex}/SUV_{ave\ cerebellum}$  were calculated. Four weeks after the surgical procedure, Morris water maze was used to assess working memory tasks with two groups of rats. The escape latency of the chronic ischemia group and the normal group at the fifth day was  $(24.16 \pm 27.18)$  s,  $(9.44 \pm 5.48)$  s, respectively. The chronic ischemia group compared with the normal group, the difference was statistically significant. The ischemic group in learning to find the platform slower than the normal rats. At the sixth day, the chronic ischemia rats by looking for the original platform quadrant after removed the platform, was slower than the normal group in Morris space exploration experiments. The chronic ischemia group was  $(2.60 \pm 1.67)$  times, the normal group was  $(6.20 \pm 2.95)$  times, the difference was statistically significant. By the Micro-PET scanning, the thalamus could be distinguished markedly during 120 minutes to 240 minutes, especially at 120 minutes. At 120 minutes,  $SUV_{ave\ thalamus}/SUV_{ave\ cerebellum}$ ,  $SUV_{ave\ frontal\ cortex}/SUV_{ave\ cerebellum}$  of the chronic ischemia cognitive dysfunction rats was  $1.27 \pm 0.02$ ,  $1.07 \pm 0.03$ , respectively. The  $SUV_{ave\ thalamus}/SUV_{ave\ cerebellum}$ ,  $SUV_{ave\ frontal\ cortex}/SUV_{ave\ cerebellum}$  of the normal group was  $1.62 \pm 0.06$  and  $1.34 \pm 0.28$ , respectively. The difference was statistically significant. 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 is suitable for nAChRs imaging. The suitable time for rats Micro-PET imaging in vivo was 120~240 minutes, especially at 120 minutes. The quantitative analysis of nAChRs in different brain regions of rats was performed in vivo, which is very useful for detecting the changes of variety receptors in chronic ischemia cognitive dysfunction rats, meanwhile lay the foundation for investigating chronic ischemia cognitive dysfunction rats in various stages or evaluating the efficacy of treatment in chronic ischemia cognitive dysfunction rats.

**Key words:** 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380; ischemia; cognitive dysfunction; nAChRs; Micro-PET; quantitative analysis

随着人类社会的老龄化,脑卒中后认知功能障碍的研究受到更多关注,慢性缺血可导致认知功能障碍,但其机制并不明确。乙酰胆碱受体(acetylcholine receptors, AChRs)之一烟碱乙酰胆碱受体(nAChRs)属于兴奋性配体-门控离子通道超家族,主要参与认知、学习、记忆、觉醒、奖赏、疼痛等生理过程及一些神经退行性疾病和精神病等病理过程<sup>[1]</sup>。2-[<sup>18</sup>F]-A-85380是目前成熟的 $\alpha_4\beta_2$  nAChRs PET显像药物之一,选择性和特异性高,主要应用于阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)、帕金森病(Parkinson's dis-

ease, PD)、精神分裂症等疾病,但用于缺血后nAChRs显像的定量研究报道较少,本研究采用双侧颈总动脉结扎法建立大鼠慢性脑缺血认知功能障碍模型,利用Micro-PET对认知功能障碍大鼠行脑部显像,定量分析受体显像剂2-[<sup>18</sup>F]-A-85380在认知功能障碍大鼠脑中的分布,为临床受体显像研究提供实验及理论依据。

## 1 实验材料

### 1.1 主要试剂

标记前体  $Me_3N^+ Boc-A-85380$ ,  $CF_3SO_3^-$ ;

德国 ABX 公司; 二甲基亚砜 (DMSO): ALDRICH 公司; 无水乙腈: Fisher ChemAlert Guide 公司; 氨基聚醚 ( $K_{2.2.2}$ ): MERCK 公司; 无水  $K_2CO_3$ : MERCK 公司; 三氟乙酸: MTEDIA 公司; 2 mol/L 的 HCL、乙醇、 $NaHCO_3$ 、生理盐水、蒸馏水、去离子水、10% 水合氯醛, 均为国产分析纯。

## 1.2 主要仪器

回旋加速器 (GE MINITrace)、 $^{18}F$ -FDG 计算机控制化学合成模块 (CPCU): GE 公司; 亲水性强阴离子交换吸附剂 (QMA)、C18 固相萃取柱: Waters 公司; 旋转蒸发器: 上海雅荣生化设备有限公司; 1260LC 液相色谱仪: Agilent 公司; Metis Micro-PET: 山东麦德盈华公司; Matrix VMR 小动物吸入麻醉机: 美国 MID-MARK 集团; Morris 水迷宫恒温游泳池: 淮北正华生物仪器设备有限公司; 无菌滤膜、手术器械、4-0 手术线。

## 1.3 实验动物

SD 大鼠: 雄性, 体重为 220~250 g, SYXK (辽) 2008-0005, 中国医科大学实验动物中心提供。

## 2 实验方法

### 2.1 显像剂 2- $[^{18}F]$ -A-85380 合成

显像剂 2- $[^{18}F]$ -A-85380 的合成过程参考文献[2]并改进。合成步骤: 1)  $^{18}F$ -FDG 计算机控制化学合成模块 (CPCU) 改造; 2) 使用回旋加速器通过  $^{18}O(p, n)^{18}F$  反应生产  $^{18}F^-$ ; 3) 前体  $Me_3N^+ Boc-A-85380, CF_3SO_3^-$  及 DMSO 在乙腈溶液中与  $^{18}F^-$  发生芳香环 2 位的取代反应; 4) 反应液经半制备型 C18 反相色谱柱分离, 收集馏分; 5) 收集到的馏分经旋转蒸发器蒸干后经生理盐水浓缩收集至产品瓶中。

### 2.2 慢性脑缺血模型制作

16 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 慢性缺血组和正常组, 每组 8 只。维持室温 ( $24 \pm 3$ )  $^{\circ}C$ , 灯光明/暗 (12/12 h) 循环。根据文献[3]报道方法改进后制作双侧颈总动脉 (2-vessel occlusion, 2VO) 结扎, 建立慢性脑缺血模型, 用 10% 水合氯醛腹腔注射进行麻醉 (0.35 mL/100 g 体重), 麻醉后行颈正中切口, 暴露双侧颈总动脉, 轻柔地分离迷走神经及周围肌肉组织, 使用

4-0 手术线结扎双侧颈总动脉, 将颈部肌肉、筋膜、皮肤逐层缝合后放入笼中饲养。术后 4 周观察大鼠行为学症状, 包括 1) 提尾行走实验: 轻提大鼠尾巴末端, 使后肢离地行走。0 分: 双前肢对称伸展, 沿直线协调行走; 1 分: 一侧前肢较对侧前肢伸展少, 稍向一侧倾斜行走; 2 分: 一侧前肢稍有伸展, 行走时向同侧打转; 3 分: 无法行走。2) 提尾悬空实验: 轻提大鼠尾巴末端, 使其悬空。0 分: 四肢协调伸展; 1 分: 一侧肢体较对侧伸展少或慢; 2 分: 两侧肢体很少伸展; 3 分: 两侧肢体不伸展。

### 2.3 TTC 染色

双侧颈总动脉结扎术 4 周后, 在缺血组和正常组大鼠内每组随机各挑选 3 只, 断颈处死, 迅速取出大脑, 将大鼠脑做冠状面切片, 层厚约为 2 mm。将脑切片置于 2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 液内,  $37^{\circ}C$  避光温育 30 min, 然后转移至 PBS 配制的福尔马林液内固定, 观察缺血灶。

### 2.4 Morris 水迷宫实验

双侧颈总动脉结扎术后 4 周, 两组大鼠行 Morris 水迷宫实验检测空间学习、记忆能力。水迷宫由直径为 200 cm 的黑色不锈钢圆池组成, 圆池高为 100 cm, 水深为 60 cm, 水迷宫自带摄像机和图像记录及处理系统。水池随机分为四个象限, 任选其中一个象限中心放置一直径为 10 cm 的平台 (水面下 2 cm), 在四个象限正对的池壁粘贴不同图案的标志。根据文献[4]对两组大鼠分别进行连续 6 d 的实验。1) 定位航行实验: 随机按四个方向将大鼠放入水中, 同时记录大鼠游泳轨迹和潜伏时间。一旦大鼠到达平台, 潜伏时间和轨迹记录就自动终止。让大鼠在平台上停留 30 s 后, 随后又开始另一轮实验, 直到 4 个象限都测试完毕将大鼠放回笼内。如果大鼠在 120 s 内不能找到平台, 则将其放到平台上 30 s, 此次时间记为 120 s。该实验连续进行 5 d。2) 空间探索实验: 实验第 6 d, 将平台移出迷宫, 将大鼠从任意一个象限放入迷宫, 记录穿过原平台的次数, 实验时间为 120 s。

### 2.5 大鼠 Micro-PET 脑显像

2.5.1 正常组大鼠脑显像 1) 图像采集。采用 Matrix VMR 麻醉机麻醉大鼠, 麻醉剂为异

氟烷/氧气混合气体,经面罩对大鼠进行麻醉,注药前诱导麻醉异氟烷浓度为2%,氧气流量为1 L/min;在动物扫描时异氟烷浓度变为1.5%,氧气流量0.5~0.7 L/min。Micro-PET扫描仪,其探测器采用闪烁晶体阵列+光电倍增管(photomultiplier, PMT)阵列的设计。主要技术参数为FOV(transaxial)128 mm;FOV(axial)59 mm;空间分辨率为1.3 mm;敏感性分别为4.3%(380~640 keV),6.0%(200~750 keV);散射分数为6.8%,Micro-PET自带衰减校正功能。大鼠麻醉后经尾静脉注射2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 37 MBq。大鼠脑部Micro-PET显像于注射2-[<sup>18</sup>F]-A-85380后30、60、120、180、240 min各扫描一次,每次10 min。大鼠扫描前无需禁食水,取仰卧位。2) 图像分析。经图像重建后获得横断面、矢状断面和冠状断面图像。以矢状面为参考平面,手动勾画每个层面丘脑、额皮质、小脑ROI,叠加后通过系统软件计算放射性摄取均值(SUV<sub>ave</sub>),窗宽窗位的设置以显示清楚结构为标准,每个时间点的ROI SUV<sub>ave</sub>测量3次,取平均值。

**2.5.2 缺血组大鼠脑显像** 经过正常组大鼠脑显像获得合适的显像时间后,慢性缺血组大鼠按照正常大鼠的扫描方法进行扫描,尾静脉注射2-[<sup>18</sup>F]-A-85380后行脑部扫描10 min。

## 2.6 统计学分析

实验数据计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ , SPSS17.0分析软件进行数据分析,以 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380的合成

2-[<sup>18</sup>F]-A-85380的HPLC分析结果示于图1。标记率为29.1%,合成3 h后用液相色谱仪测得其放化纯度为95.34%。

### 3.2 行为学症状观察

缺血组大鼠双侧颈总动脉结扎术后4周观察行为学症状,缺血组与正常组得分均为0分,未出现明显的运动障碍,进食、水尚可。与正常组大鼠比较未见明显差异(表1)。

### 3.3 TTC

正常组大鼠与缺血组大鼠TTC结果示于图2。由图2结果可见,缺血组出现缺血灶,正

常组无缺血灶,表明造模成功。

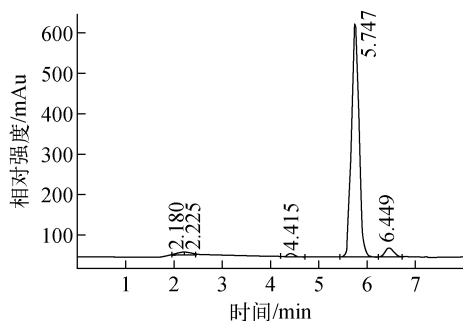


图1 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 HPLC谱图

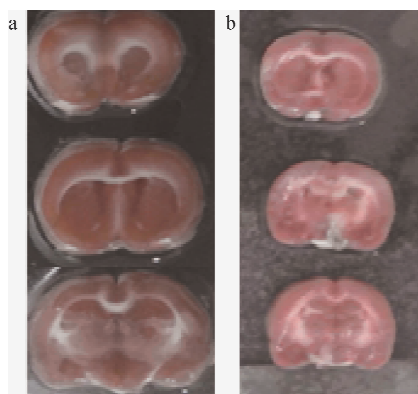
Fig. 1 Analysis of the results of 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 radiation chemical purity (HPLC)

表1 正常组与慢性缺血组大鼠行为学症状比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Comparison of behavioral symptoms in normal group and chronic ischemic group rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	大鼠/只	提尾行走 时间/min	提尾悬空 时间/min
正常组	5	0	0
慢性缺血组	5	0	0

注:与正常组相比, $P > 0.05$



a——正常组;b——缺血组

图2 大鼠TTC染色结果

a——The normal group;b——The ischemia group

Fig. 2 TTC dyeing results of rats

### 3.4 Morris水迷宫实验结果

水迷宫定位航行实验逃避潜伏期变化结果列于表2。两组大鼠逃避潜伏期随实验天数增加而缩短,慢性缺血组与正常组相比,差异有统计学意义,慢性缺血组在学习寻找平台上较正常大鼠缓慢。

表2 正常组与慢性缺血组大鼠水迷宫定位航行实验逃避潜伏期变化( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 2 The water maze navigation experiment escape latency change in normal group and chronic ischemic group rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	大鼠/只	逃避潜伏期				
		第一天/s	第二天/s	第三天/s	第四天/s	第五天/s
正常组	5	16.88±14.16	11.77±7.94	11.08±9.76	10.11±6.06	9.44±5.48
慢性缺血组	5	51.84±41.57 <sup>1)</sup>	36.22±30.77 <sup>2)</sup>	25.90±25.98 <sup>3)</sup>	24.79±25.68 <sup>4)</sup>	24.16±27.18 <sup>5)</sup>

注:与正常组相比,1)  $P_1=0.000$ ,2)  $P_2=0.000$ ,3)  $P_3=0.004$ ,4)  $P_4=0.003$ ,5)  $P_5=0.003$ ,均 $<0.05$

Morris 水迷宫定向航行实验轨迹示于图3,慢性缺血组大鼠与正常组大鼠在相同的象限入水点,缺血组所需时间更长,轨迹更混乱,而正常组能更快、更准确找到平台,表明缺血组大鼠出现学习功能障碍。

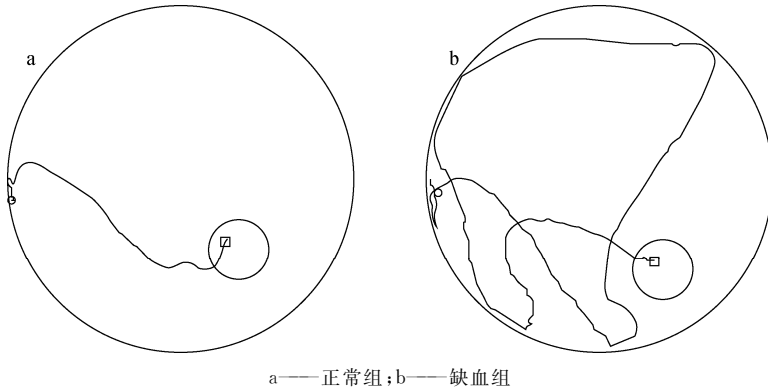


图3 Morris水迷宫定向航行实验轨迹图

a——The normal group;b——The ischemia group

Fig. 3 Trajectory map of Morris water maze navigation experiment

表3 正常组与慢性缺血组大鼠水迷宫空间探索实验穿过站台次数变化( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 3 The number of normal group and chronic ischemic group water maze space exploration experiment through platform ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	大鼠/只	站台穿过次数/次
正常组	5	6.20±2.95
慢性缺血组	5	2.60±1.67 <sup>1)</sup>

注:1) 与正常组相比, $P=0.032$ , $<0.05$

### 3.5 大鼠 Micro-PET 显像及定量分析

正常大鼠脑 Micro-PET 显像结果示于图4,丘脑在120~240 min时显示清晰。丘脑、额皮质、小脑  $SUV_{ave}$  在240 min达到峰值,分别为  $35.39 \pm 0.15$ 、 $30.33 \pm 0.36$ 、 $22.53 \pm 0.43$ (表4)。丘脑和额皮质与小脑的比值均在240 min达到最高峰, $SUV_{ave丘脑}/SUV_{ave小脑}$ 、

水迷宫空间探索实验结果列于表3。撤掉平台后,慢性缺血组大鼠按之前学习寻找平台的轨迹,穿过原来放置平台的象限次数较少,差异有统计学意义,表明缺血组大鼠记忆功能出现障碍。

$SUV_{ave额皮质}/SUV_{ave小脑}$  分别为  $1.62 \pm 0.06$ 、 $1.34 \pm 0.28$ (表5)。

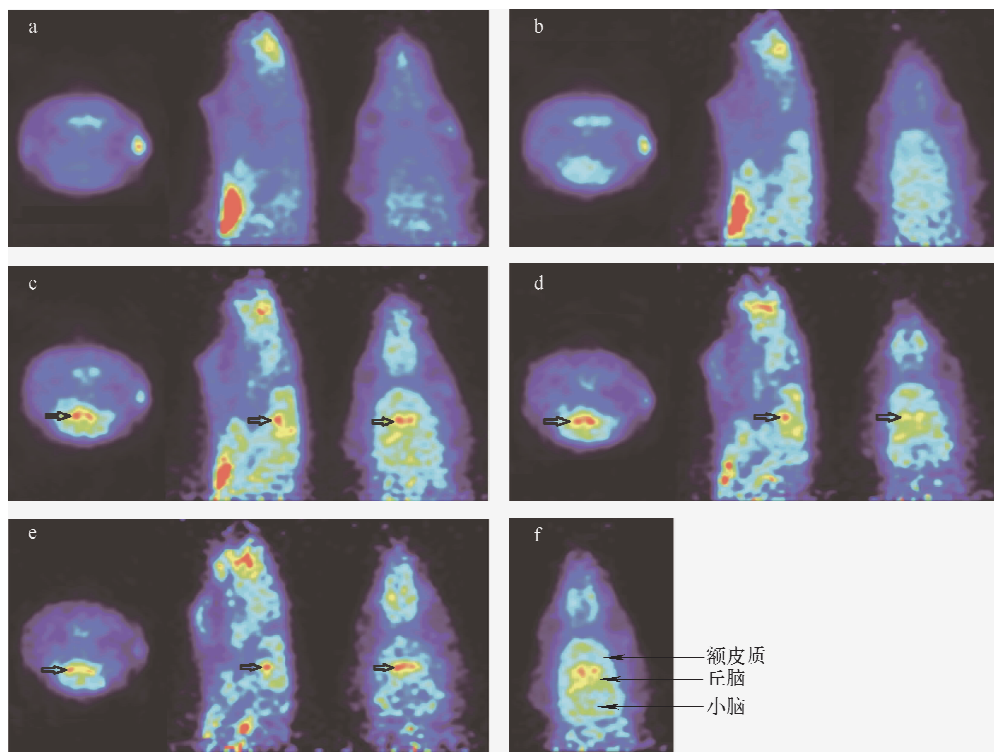
正常组大鼠与缺血组大鼠注射  $2-[^{18}F]-A-85380$  后120 min脑显像结果示于图5,缺血组大鼠全脑显像剂摄取降低,尤以丘脑明显。 $SUV_{ave丘脑}/SUV_{ave小脑}$ 、 $SUV_{ave额皮质}/SUV_{ave小脑}$  值列于表6,缺血组大鼠  $SUV_{ave丘脑}/SUV_{ave小脑}$ 、 $SUV_{ave额皮质}/SUV_{ave小脑}$  显著下降,差异有统计学意义。

## 4 讨论

慢性脑缺血可能是导致血管性痴呆的主要原因<sup>[4]</sup>,血管性痴呆患者出现认知损害的机制尚不十分清楚,以往认为大多数血管性痴呆由多发性脑梗死所致,但目前更多研究显示胆碱系统参与血管性痴呆发生的可能机制。故本实

验采用双侧颈总动脉结扎的方法制作慢性缺血模型,通过 Morris 水迷宫实验证实慢性缺血组

大鼠较正常组学习和记忆力明显下降,说明慢性脑缺血可导致认知功能障碍。



a、b、c、d、e 分别表示大鼠 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 30、60、120、180、240 min 脑显像;左、中、右分别为冠状面,矢状面,横断面;  
c、d、e 中箭头所指为丘脑结构;f 为大鼠 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 120 min 头部额皮质、丘脑、小脑勾画图

图 4 大鼠脑 Micro-PET 显像

a, b, c, d, e respectively expressed the rat 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 brain imaging at 30, 60, 120, 180, 240 minutes;

The left was the chart for the coronal plane, the middle was the sagittal plane, the right side was the map for the cross section;

c, d, e three figure The arrow in figure c, d, e refers to the structure of the thalamus;

Figure f of the rat 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 120 minutes head frontal cortex, thalamus, cerebellum sketch map

Fig. 4 Micro-PET imaging of 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380

表 4 正常大鼠注射 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 后不同时间点丘脑、额皮质、小脑的 SUV<sub>ave</sub> 值 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

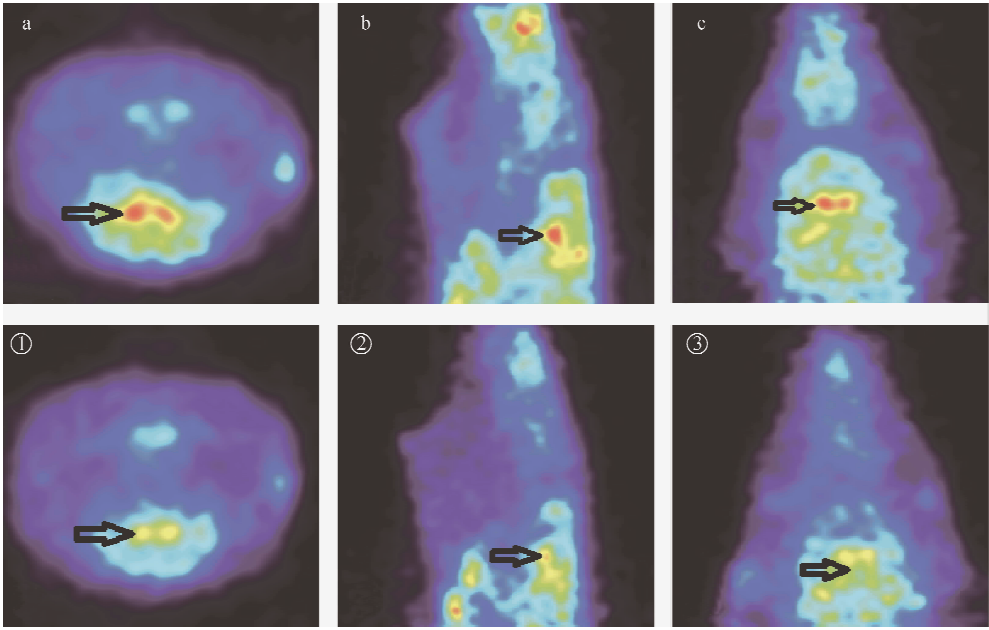
Table 4 SUV<sub>ave</sub> value of thalamus, frontal cortex and cerebellum at different time points after injection of 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 in normal rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

器官	不同时间(min)各器官的 SUV <sub>ave</sub> 值				
	30	60	120	180	240
丘脑	9.30 ± 0.09	11.23 ± 0.11	16.47 ± 0.18	24.09 ± 0.15	35.39 ± 0.15
额皮质	8.01 ± 0.11	9.67 ± 0.13	14.14 ± 0.24	20.71 ± 0.26	30.33 ± 0.36
小脑	7.39 ± 0.20	8.09 ± 0.09	11.19 ± 0.16	16.06 ± 0.03	22.53 ± 0.43

表 5 正常大鼠注射 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 后不同时间点放射性摄取比 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Different time points of radioactive uptake ratio in normal rats were injected with 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

放射性摄取比	不同时间(min)各器官的 SUV <sub>ave</sub> 值				
	30	60	120	180	240
SUV <sub>ave</sub> 丘脑/SUV <sub>ave</sub> 小脑	1.26 ± 0.43	1.39 ± 0.27	1.47 ± 0.02	1.50 ± 0.01	1.62 ± 0.06
SUV <sub>ave</sub> 额皮质/SUV <sub>ave</sub> 小脑	1.08 ± 0.19	1.20 ± 0.11	1.26 ± 0.02	1.29 ± 0.02	1.34 ± 0.28



a, b, c 图为正常大鼠; ①、②、③ 图为慢性缺血大鼠在 120 min 水平位、矢状位、冠状位脑显像

图 5 正常大鼠与缺血大鼠在 120 min 脑显像

a, b, c were normal rats; ①、②、③ images were brain imaging in chronic cerebral ischemia rats of horizontal, sagittal and coronal

Fig. 5 Images of normal and chronic ischemic rats at 120 minutes

表 6 注射 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 后 120 min

SUV<sub>ave</sub>丘脑 / SUV<sub>ave</sub>小脑、SUV<sub>ave</sub>额皮质 / SUV<sub>ave</sub>小脑 值 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 6 The value of SUV<sub>ave</sub> thalamus / SUV<sub>ave</sub> cerebellum ,  
SUV<sub>ave</sub> frontal cortex / SUV<sub>ave</sub> cerebellum after injection  
2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 for 120 minutes ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	大鼠/只	SUV <sub>ave</sub> 丘脑 / SUV <sub>ave</sub> 小脑	SUV <sub>ave</sub> 额皮质 / SUV <sub>ave</sub> 小脑
正常组	5	1.47 ± 0.02	1.27 ± 0.02
慢性缺血组	5	1.26 ± 0.02 <sup>P<sub>1</sub></sup>	1.07 ± 0.03 <sup>P<sub>2</sub></sup>

注:与正常组相比,  $P_1 = P_2 = 0.001$ , 均  $< 0.05$

本实验选取额皮质、丘脑等脑区,研究发现缺血组大鼠 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 Micro-PET 显像测得的 SUV<sub>ave</sub>丘脑 / SUV<sub>ave</sub>小脑、SUV<sub>ave</sub>额皮质 / SUV<sub>ave</sub>小脑 较正常大鼠显著下降,说明缺血后认知功能障碍与胆碱系统相关,同时证明缺血后认知功能障碍与额皮质和丘脑的烟碱乙酰胆碱受体受损有关。额皮质和丘脑参与缺血后认知功能障碍,可能原因有两方面。1) 额叶,特别是前额叶区与认知功能关系最为密切,主要参与注意、记忆、执行、推理和抽象思维等高级活动。前额皮质的病变和异常使维持信息传递的活性物质,如胆碱的传导通路受到损害,引起认知障碍<sup>[6]</sup>。

2) 丘脑参与注意、语言、记忆等认知活动<sup>[7]</sup>。除此之外,本课题组之前对脑卒中后认知功能障碍半侧空间忽略进行脑血流灌注显像研究提示,半侧空间忽略与额叶、颞顶枕交界区关系最为密切<sup>[8]</sup>。大鼠双侧颈总动脉结扎后 1 个月纹状体乙酰胆碱水平降低,双侧颈总动脉结扎后 4 个月皮质、纹状体和下丘脑乙酰胆碱水平及皮质、海马、纹状体和下丘脑胆碱水平明显下降,这种胆碱能功能紊乱与大鼠认知损害有关<sup>[9]</sup>。有研究者发现在双侧颈总动脉结扎条件下,选择性  $\alpha_1\beta_2$  nAChRs 激动剂可延长学习行为<sup>[10-11]</sup>。

对于脑卒中发生认知功能障碍中涉及胆碱系统的可能机制, WANG 等<sup>[12]</sup>总结发现在发生缺血事件后,最先出现变化的是能量降低,接着出现炎症的级联反应,脑缺血后,包括细胞内粘附分子 1、选择素、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白介素-1 $\beta$ 、一氧化氮(NO)、环氧合酶-2(COX-2)、周围白细胞聚集反应、残留神经胶质细胞(小胶质细胞和星形细胞)活化上调。一旦活化,免疫细胞可能会释放一系列毒素介质,如附加的炎症前细胞因子、NO、谷氨酸。这些物质降解血脑屏障(BBB),再次出现缺血性脑损伤。周围白细胞的继续聚

集作用会导致微血管阻塞,加重局部脑损伤。之后出现胆碱能细胞损伤,包括胆碱乙酰基转移酶、乙酰胆碱、乙酰胆碱受体下降,而胆碱酯酶活性升高,造成细胞死亡,所以目前有许多研究致力于胆碱酯酶抑制剂。Nanri<sup>[13]</sup>等发现预注射尼古丁、胆碱酯酶抑制剂可减轻全脑缺血沙土鼠的细胞死亡及被动躲避的损害,改善缺血后的认知障碍。疾病的最后阶段会出现脑萎缩导致认知障碍或痴呆。本研究通过 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 Micro-PET 显像研究证实脑卒中后认知功能障碍和 nAChRs 受损有关,揭示了脑卒中后认知功能障碍的受体机制。

通过手动勾画丘脑、额皮质、小脑的 ROI,计算各自  $SUV_{ave}$ ,以及  $SUV_{ave丘脑}/SUV_{ave小脑}$ 、 $SUV_{ave额皮质}/SUV_{ave小脑}$  比值,可反映丘脑、额皮质  $\alpha_1\beta_2$  nAChRs 变化趋势。正常大鼠在注射 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 后 120~240 min,丘脑显示清晰,考虑 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 应用于临床的需要,为患者缩短检查的次数及时间,本实验选取 120 min 时间点进行扫描,并扫描 10 min。120 min 时缺血组大鼠脑显像定量分析显示  $SUV_{ave丘脑}/SUV_{ave小脑}$ 、 $SUV_{ave额皮质}/SUV_{ave小脑}$  比值较正常组明显降低,选取 120 min 作为显像的最佳时间,也间接反映了脑缺血后 nAChRs 受体数量降低或 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 与受体结合率降低。采用 <sup>123</sup>I-5IA-85380 扫描,<sup>123</sup>I-5IA-85380 是另一种用于 SPECT 显像的  $\alpha_1\beta_2$  nAChRs 显像剂,实验观察 14 名血管性痴呆患者和 16 名健康对照组  $\alpha_1\beta_2$  nAChRs 变化,并使用 SPM 法进行图像分析,与对照组相比,血管性痴呆患者出现背侧丘脑和右侧尾状核<sup>123</sup>I-5IA-85380 摄取相对减少;而楔核摄取增加,可能是对背侧丘脑胆碱活性减少的补偿反应<sup>[14]</sup>。缺血产生的神经元变性也会发生于纹状体、脑皮质、丘脑。双侧颈总动脉结扎方法制作慢性脑缺血模型,皮质血流量减少几乎为全脑的 35%~45%,这种灌注不足看做是维持适度的血糖过低的慢性阶段,病理生理条件近似于痴呆患者减少的脑血流<sup>[18]</sup>。脑血管痴呆患者会出现中枢胆碱系统障碍。刺激中枢 nAChRs 能改善血管性痴呆患者的认知功能障碍<sup>[19]</sup>。双侧颈总动脉结扎大鼠的认知功能损害与多发梗塞灶及脑中乙酰胆碱水平减少有关。双侧颈总动脉结扎产生的病理学与多发梗塞灶

引起的痴呆患者相似<sup>[20]</sup>。本研究发现缺血组大鼠  $SUV_{ave丘脑}/SUV_{ave小脑}$ 、 $SUV_{ave额皮质}/SUV_{ave小脑}$  显著下降,差异有统计学意义,与上述文献报道结果相似,同样证明了缺血后认知障碍与胆碱系统相关,与丘脑、额皮质  $\alpha_1\beta_2$  nAChRs 减少有关。

对于 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 的研究国外已将其应用于 AD、MCI(mild cognitive impairment,轻度认知障碍)及 PD<sup>[15]</sup> 患者中,如 Sabri 等<sup>[16]</sup> 行 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 显像发现 AD 患者脑中海马、尾状核、额皮质、颞皮质、后扣带回、前扣带回、顶皮质的  $\alpha_1\beta_2$  nAChRs 显著减少。Meyer 等<sup>[17]</sup> 发现 PD 患者中脑、桥脑、前扣带回皮质、额顶皮质、小脑摄取 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 BP(binding potential,结合可能性)减少。本研究结果可进一步应用于对如 AD、PD 等神经精神疾病所致的认知功能障碍与胆碱系统的发生机制研究,或进一步对尼古丁及乙酰胆碱受体激动剂对认知功能障碍的保护作用机制研究及治疗方法的探索。

本研究发现双侧颈总动脉结扎术后 4 周出现认知功能障碍的大鼠未表现明显的运动障碍,可能是因为双侧颈总动脉结扎后,仍存在有效的侧支循环<sup>[16]</sup>,同时表明慢性缺血大鼠在未出现运动症状前就出现了认知功能障碍,其额皮质和丘脑的烟碱乙酰胆碱受体在运动症状出现前就已经发生了变化,因此,通过 nAChRs 受体显像能更灵敏、更早期发现认知功能障碍。

## 5 小结

通过大鼠 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 Micro-PET 脑显像研究,发现慢性缺血后认知功能障碍与胆碱系统相关,与丘脑和额皮质的 nAChRs 减少有关。缺血后认知功能障碍大鼠在出现运动症状前就已有认知功能障碍,丘脑和额皮质的受体数量减少,通过 nAChRs 受体显像可在慢性缺血后认知功能障碍患者中早期发现受体改变,及早给予干预和治疗,改善预后。

## 参考文献:

- [1] Mo Y X, Yin Y F, Li Y M. Neural nAChRs PET imaging probes[J]. Nuclear Medicine Communications, 2014, 35(2): 135-143.
- [2] 黄乐乐,刁尧,尹雅芙,等. 烟碱乙酰胆碱受体显

- 像剂 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 的合成及小鼠体内分步[J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(9):777-780.
- Huang Lele, Diao Yao, Yin Yafu, et al. Radiosynthesis of 2-[<sup>18</sup>F]-A-85380 and its biodistribution in mice[J]. Journal of China Medical University, 2013, 42(9): 777-780(in Chinese).
- [3] Farkas E, Luiten P G, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat; a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases[J]. Brain Res Rev, 2007, 54(1): 162-180.
- [4] Xiao Y, Guan Z Z, Wu C X, et al. Correlations between cholinesterase activity and cognitive scores in post-ischemic rats and patients with vascular dementia[J]. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32(3): 399-407.
- [5] Le Foll B, Chefer S I, Kimes A S, et al. Impact of short access nicotine self-administration on expression of  $\alpha_1\beta_2$  nicotinic acetylcholine receptors in non-human primates[J]. Psychopharmacology, 2016, 233(10): 1 829-1 835.
- [6] Gold G, Kovari E, Hof P R, et al. Cognitive consequences of thalamic, basal ganglia, and deep white matter lacunes in brain aging and dementia[J]. Stroke, 2005, 36(6): 1 184-1 188.
- [7] Taniwaki T, Okayama A, Shigeto H, et al. Functional network of the basal ganglia and cerebellar motor loops in vivo; Different activation patterns between self-initiated and externally triggered movements[J]. Neuroimage, 2006, 31(2): 745-753.
- [8] Yin Y F, Li X N, Li Y M, et al. Preliminary clinical study in patients with hemispatial neglect after stroke by neglect test battery and <sup>99m</sup>Tc-ECD SPECT[J]. Nuclear Medicine and Biology, 2009, 36(4): 467-475.
- [9] Ni J W, Matsumoto K, Li H B, et al. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat[J]. Brain Research, 1995, 673(2): 290-296.
- [10] Zakharova E I, Storozheva Z I, Dudchenko A M, et al. Chronic cerebral ischaemia forms new cholinergic mechanisms of learning and memory[J]. International Journal of Alzheimer's Disease, 2010: 1-17.
- [11] Cloke J M, Winters B D.  $\alpha_2\beta_4$  Nicotinic receptor stimulation of the GABAergic system within the orbitofrontal cortex ameliorates the severe cross-modal object recognition impairment in ketamine-treated rats: implications for cognitive dysfunction in schizophrenia[J]. Neuropharmacology, 2015, (90): 42-52.
- [12] Wang J, Zhang H Y, Tang X C. Cholinergic deficiency involved in vascular dementia: possible mechanism and strategy of treatment[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2009, 30(7): 879-888.
- [13] Nanri M, Miyake H, Murakami Y, et al. GTS-21, a nicotinic agonist, attenuates multiple infarctions and cognitive deficit caused by permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rats[J]. Jpn J Pharmacol, 1998, 78(4): 463-469.
- [14] Colloby S J, Firbanka M J, Pakrasia S, et al. Alterations in nicotinic  $\alpha_1\beta_2$  receptor binding in vascular dementia using <sup>123</sup>I-<sup>5</sup>IA-85380 SPECT: Comparison with regional cerebral blood flow[J]. Neurobiology of Aging, 2011, 32(2): 293-301.
- [15] 姜玉艳, 尹雅芙, 罗晓光, 等. 烟碱型乙酰胆碱受体在帕金森病认知功能障碍中的作用[J]. 中国临床医学影像杂志, 2014, 25(2): 887-889.
- Jiang Yuyan, Yin Yafu, Luo Xiaoguang, et al. The function of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson's disease with cognitive disorder[J]. Journal China Clinic Medicine Imaging, 2014, 25(2): 887-889(in Chinese).
- [16] Sabri O, Kendziorra K, Wolf H, et al. Acetylcholine receptors in dementia and mild cognitive impairment[J]. European Journal of Nuclear Medicine And Molecular Imaging, 2008, 35(1): 30-45.
- [17] Meyer P M, Strecker K, Kendziorra K, et al. Reduced  $\alpha_1\beta_2$  \* -nicotinic acetylcholine receptor binding and its relationship to mild cognitive and depressive symptoms in Parkinson disease[J]. Arch Gen Psychiatry, 2009, 66(8): 866-877.
- [18] Cechetti F, Worm P V, Pereira L O, et al. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2010, 43(12): 1 178-1 183.
- [19] Thomsen M S, Andreasen J T, Arvaniti M, et al. Nicotinic acetylcholine receptors in the pathophysiology of alzheimer's disease: the role of protein-protein interactions in current and future treatment[J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(14): 2 015-2 034.
- [20] Nanri M I, Miyake H, Murakami Y, et al. GTS-21, a nicotinic agonist, attenuates multiple infarctions and cognitive deficit caused by permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rats[J]. Jpn J Pharmacol, 1998, 78(4): 463-469.