

# 糖尿病加重慢性脑低灌注大鼠空间学习记忆能力损害及机制探讨

李玉梅 刘雨 张婷 付剑亮

**【摘要】** 目的 探讨 2 型糖尿病(DM)加重慢性脑低灌注(CCH)大鼠空间学习记忆能力损害及其可能机制。方法 成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠经高脂饮食饲养 4 周后予小剂量链脲佐菌素腹腔注射制备 2 型糖尿病模型、双侧颈总动脉永久性结扎制备慢性脑低灌注模型。采用 Morris 水迷宫实验测试大鼠空间学习记忆能力,免疫荧光染色和 Western blotting 法检测海马淀粉样前体蛋白  $\beta$  位点剪切酶-1 (BACE-1) 阳性神经元数目及其相对表达量。结果 与对照组相比,DM + CCH 组大鼠 Morris 水迷宫实验第 2~5 天逃避潜伏期延长[(54.60 ± 3.75) s vs (25.99 ± 4.10) s,  $P = 0.000$ ; (45.39 ± 2.78) s vs (27.50 ± 4.39) s,  $P = 0.003$ ; (39.71 ± 3.47) s vs (20.34 ± 3.69) s,  $P = 0.001$ ; (41.43 ± 4.48) s vs (11.35 ± 3.95) s,  $P = 0.000$ ],第 6 天目标象限游泳时间百分比降低[(22.38 ± 3.41)% vs (43.69 ± 3.22)% ,  $P = 0.000$ ];海马 BACE-1 阳性神经元数目增加、相对表达量显著升高(0.23 ± 0.04 vs 0.06 ± 0.02,  $P = 0.005$ )。结论 2 型糖尿病伴慢性脑低灌注可以加重大鼠空间学习记忆能力障碍,其机制可能与海马神经元 BACE-1 表达水平升高有关。

**【关键词】** 糖尿病, 2 型; 认知障碍; 海马; 淀粉样前体蛋白分泌酶类; 荧光免疫测定; 免疫印迹法; 疾病模型, 动物

## Aggravation of spatial learning and memory impairment by type 2 diabetes mellitus in rats with chronic cerebral hypoperfusion and its possible mechanism

LI Yu-mei<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>2</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, FU Jian-liang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

<sup>2</sup>Department of Emergency, Shanghai Eighth People Hospital, Shanghai 200235, China

Corresponding author: FU Jian-liang (Email: fujianliang@163.com)

**【Abstract】** **Objective** To explore whether type 2 diabetes mellitus (DM) aggravates the spatial learning and memory impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion (CCH) and the possible mechanism. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 4 groups: control group (normal diet + sham); DM group [high-fat diet + streptozocin (STZ) injection]; CCH group [normal diet + two vessel occlusion (2-VO)] and DM + CCH group (high-fat diet + STZ injection + 2-VO). All rats were submitted to behavioral testing for spatial learning and memory in Morris water maze test, and immunofluorescence staining to detect hippocampal  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE-1) positive cells. The relative expressions of BACE-1 in hippocampus were detected with Western blotting. **Results** Morris water maze test showed escape latency of DM + CCH group was significantly longer than control group on 2nd-5th days [(54.60 ± 3.75) s vs (25.99 ± 4.10) s,  $P = 0.000$ ; (45.39 ± 2.78) s vs (27.50 ± 4.39) s,  $P = 0.003$ ; (39.71 ± 3.47) s vs (20.34 ± 3.69) s,  $P = 0.001$ ; (41.43 ± 4.48) s vs (11.35 ± 3.95) s,  $P = 0.000$ ]. The percentage of target quadrant time in DM + CCH group on the 6th day was significantly reduced compared with the control group [(22.38 ± 3.41)% vs (43.69 ± 3.22)% ,  $P = 0.000$ ]. Compared with control group, BACE-1 positive cells significantly increased in the hippocampus of DM + CCH group, and

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2014.06.010

基金项目:上海市医学会“神经疾病转化研究”科学基金资助项目(项目编号:SHNR-006)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院神经内科(李玉梅,张婷,付剑亮);200235 上海市第八人民医院急诊科(刘雨)

通讯作者:付剑亮(Email:fujianliang@163.com)

the relative expression of BACE - 1 increased statistically ( $0.23 \pm 0.04$  vs  $0.06 \pm 0.02$ ,  $P = 0.005$ ).

**Conclusions** Type 2 diabetes mellitus exacerbates spatial learning and memory impairment of rats with chronic cerebral hypoperfusion, which may be related to the abnormal expression of BACE - 1 in the hippocampus of rats.

**【Key words】** Diabetes mellitus, type 2; Cognition disorders; Hippocampus; Amyloid precursor protein secretases; Fluoroimmunoassay; Immunoblotting; Disease models, animal

This study was supported by Neurological Disease Translational Research Fund of Shanghai Medical Association (No. SHNR-006).

慢性脑低灌注(CCH)是老龄化相关痴呆的主要原因<sup>[1]</sup>,早期以认知损害为主要表现,最终导致持久性或进展性认知和神经功能障碍。2型糖尿病(DM)作为痴呆的重要危险因素<sup>[2]</sup>,除表现为血糖水平升高外,另一重要特征是胰岛素抵抗<sup>[3]</sup>,常与慢性脑低灌注相伴发,进一步加重神经退行性变。在本研究中,我们构建糖尿病-慢性脑低灌注大鼠模型,模拟临床常见的2型糖尿病伴慢性脑低灌注的病理状态,观察大鼠认知功能改变、检测海马组织淀粉样前体蛋白 $\beta$ 位点剪切酶-1(BACE-1)表达变化,以探讨2型糖尿病伴慢性脑低灌注对大鼠空间学习记忆能力的影响及其可能机制。

## 材料与方 法

### 一、实验材料

1. 实验动物与分组 共24只8周龄雄性清洁级Sprague-Dawley(SD)大鼠,体重( $220 \pm 20$ )g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。分别以质量分数为40%脂肪供能的高脂饲料(繁殖鼠料546g/kg、猪油169g/kg、蔗糖140g/kg、酪蛋白102g/kg、预混料21g/kg、麦芽糊精22g/kg)或10%脂肪供能的正常饲料饲养大鼠,两种饲料均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。按照抽签法随机分为正常对照组(对照组,正常饮食)、糖尿病组[DM组,高脂饮食4周+链脲佐菌素(35mg/kg)腹腔注射]、慢性脑低灌注组(CCH组,正常饮食+双侧颈总动脉永久性结扎)、糖尿病伴慢性脑低灌注组[DM+CCH组,高脂饮食4周+链脲佐菌素(35mg/kg)腹腔注射+双侧颈总动脉永久性结扎],每组各6只大鼠。于安静环境下分笼饲养,室温控制在( $22 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度60%,光线自动控制、12h白昼-12h黑夜交替,充足清洁摄食、饮水。

2. 试剂与仪器 (1)主要试剂:链脲佐菌素(含链脲菌素1g)为美国Sigma公司产品,使用时以0.10mol/L柠檬酸缓冲液(pH值4.50)稀释。免疫试

剂中I抗[为兔抗大鼠BACE-1多克隆抗体(Western blotting检测滴度1:1000、免疫荧光检测滴度1:100)]购自美国Millipore公司,II抗[含小鼠抗兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(Western blotting检测滴度1:5000)和山羊抗兔IgG(H+L)单克隆抗体(免疫荧光检测滴度1:500)]分别由北京康为世纪生物科技有限公司和美国Life Technologies公司提供。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)为美国Sigma公司产品。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自上海冠泰生物科技有限公司。(2)仪器与设备:7600型全自动生化分析仪购自日本Hitachi公司。Morris水迷宫实验仪器由淮北正华生物仪器设备有限公司提供。

### 二、实验方法

1. 糖尿病-慢性脑低灌注模型制备 (1)糖尿病模型制备:参照文献[4]方法,大鼠经高脂饮食饲养4周后禁食12h以上,腹腔注射质量分数为1%链脲佐菌素(35mg/kg),分别于注射后72h和1周时检测大鼠空腹血糖(FBG)水平,连续2次 $> 16.70$ mmol/L即为模型制备成功。1个月后经心脏采集血液标本,检测空腹血糖、空腹血清胰岛素(FSI)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)水平。(2)慢性脑低灌注模型制备:参照文献[5]方法,于糖尿病模型制备2周后对大鼠行双侧颈总动脉永久性结扎,术前12h禁食,自由饮水。质量分数为10%水合氯醛(4ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定于鼠台,剪毛备皮,碘伏乙醇常规消毒。行颈正中切口约1cm,钝性分离皮下组织,分离双侧颈总动脉,4-0丝线双重结扎。术中避免钳夹和过度牵拉迷走神经,严格按照无菌操作原则,手术结束行间断缝合。术后第1~3天每日以碘酊消毒伤口和周围皮肤。对照组大鼠仅行颈部切口、钝性分离而不结扎双侧颈总动脉。

2. 行为学观察 模型制备后3周,参照文献[6]方法,采用Morris水迷宫实验对大鼠进行空间学习记忆能力测试。水池直径180cm、高50cm、水深

30 cm, 水温(22±2)℃。水池共分为 4 个象限, 任选其一(本实验选择第 3 象限), 正中放置顶端平面为 10 cm×10 cm 的平台, 高 28 cm, 低于水面 2 cm, 水中加入黑色墨水直至无法见到平台, 水池周围参照物保持不变。(1)定位航行实验: 共 5 d, 每日下午进行一个系列, 每一系列包括 4 次。大鼠面向池壁从东南、西北、北、东共 4 个不同象限入水, 大鼠发现平台后在平台上停留 20 s、休息 60 s, 再随机由下一象限入水; 记录大鼠发现平台时间即逃避潜伏期。若大鼠入水后 90 s 内找不到平台, 则由操作者帮助其上平台, 逃避潜伏期最高为 90 s。(2)空间探索实验: 于定位航行实验后第 1 天(本实验第 6 天)撤去平台, 仍将大鼠放入原平台所在象限水中, 记录 90 s 内大鼠穿过该象限即目标象限时间, 计算目标象限游泳时间与总游泳时间(90 s)之比值。为排除视觉损害对测试成绩的影响, 行可视平台实验, 即平台露出水面 1 cm 时, 观察大鼠到达平台的时间。

3. 海马神经元 BACE-1 检测 (1)组织标本制作: Morris 水迷宫实验结束后第 2 天, 以 10% 水合氯醛(4 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 经左心室插管至升主动脉, 250 ml 生理盐水快速灌注冲洗至清澈, 冰上断头取脑, 自中线分开两个大脑半球。任选其一, 置于质量分数为 4% 多聚甲醛溶液中浸泡固定 12~24 h, 二甲苯透明、乙醇脱水、浸蜡、包埋, 连续冠状切片, 层厚 4 μm, 行免疫荧光染色; 另一大脑半球参照文献[7]方法分离海马组织, -80℃保存, 行 Western blotting 检测。(2)免疫荧光染色: 按文献[8]方法, 脑组织切片脱蜡至水, 60℃放置 30 min, 二甲苯脱蜡、乙醇梯度复水。置柠檬酸修复液(pH 值 6)中微波高火修复抗原 2 min、98℃水浴 30 min, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次); 再以体积分数为 0.2% 的 Triton 试剂反应 5 min, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次); 质量分数为 10% 山羊血清封闭 30 min, 滴加兔抗大鼠 BACE-1 多克隆 I 抗(1:200), 4℃过夜, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次); 37℃、Alexa Fluor-488 标记的山羊抗兔 IgG(H+L) II 抗反应 2 h, 滴加 DAPI 共反应 8 min, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次); 甘油封片、固定, 于荧光显微镜下即刻观察(若不能即刻观察, 则 4℃避光保存至第 2 天观察)。(3)Western blotting 检测: 按照试剂盒说明书, 取海马组织 50~100 mg, 滴加 0.80 ml 裂解液、匀浆, 25×10<sup>3</sup>×g 离心 15 min, 取上清液; 二辛可宁酸(BCA)检测试剂盒定量测定, 以 40 μg/孔进行蛋白

质变性上样。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)时以体积分数为 5% 浓缩胶在 60 V 电压下跑胶 30 min、10% 分离胶在 120 V 电压下跑胶 90 min, 湿转法在 100 V 电压下转膜 60 min, 将蛋白质转移至硝酸纤维素(NC)膜; 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 滴加兔抗大鼠 BACE-1 多克隆 I 抗(1:1000), 4℃过夜, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次); 再滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(H+L) II 抗(1:5000), 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次); 加入 ECL 化学发光底物反应 1 min、X 线曝光。采用 ImageJ 2.1.4.7 软件(中国科学院上海生命科学研究院)分析电泳条带灰度值, 计算目的蛋白 BACE-1 与内参 GAPDH 灰度值之比。Western blotting 检测均在同组不同样品上重复 3 次, 取其平均值。

### 三、统计分析方法

采用 SPSS 15.0 统计软件进行数据计算与分析。计数资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两样本均数的比较采用两独立样本的 *t* 检验; 两组大鼠术后各观察时间点 Morris 水迷宫实验成绩的比较采用重复测量设计的方差分析, 两两比较行 LSD-*t* 检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

与非糖尿病组相比, 糖尿病组大鼠体重和空腹血糖、空腹血清胰岛素、甘油三酯、胆固醇水平均升高( $P = 0.000$ , 表 1)。

Morris 水迷宫定位航行实验显示, 不同处理组大鼠除第 1 天外, 其余各观察时间点组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 其中 DM+CCH 组大鼠逃避潜伏期于第 2~5 天延长且高于对照组( $P = 0.000$ 、0.003、0.001 和 0.000; 表 2, 3)。空间探索实验显示, DM+CCH 组大鼠第 6 天目标象限游泳时间百分比低于对照组( $P = 0.000$ )、慢性脑低灌注组( $P = 0.004$ )和糖尿病组( $P = 0.004$ , 表 4); 可视平台实验显示, 不同处理组大鼠达平台时间均 < 30 s 且组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表 5), 表明可以排除视觉损害对大鼠行为学的影响。

免疫荧光染色, 不同处理组大鼠海马组织中均可见绿色荧光颗粒分布于神经元胞质, 其中 DM+CCH 组大鼠海马 BACE-1 阳性神经元数目高于其他各组; 对照组大鼠海马仅显示呈蓝染的细胞核, 几无 BACE-1 阳性神经元分布; 糖尿病组和慢性脑低

**表 1** 糖尿病组与非糖尿病组大鼠各项指标的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1.** Comparison of the indicators of rats in DM and non-DM groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group          | N  | Weight (g)    | FBG (mmol/L) | FSI (ng/ml) | TG (mmol/L) | TC (mmol/L) |
|----------------|----|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Non-DM         | 12 | 403.90 ± 3.77 | 5.16 ± 0.53  | 0.54 ± 0.17 | 0.83 ± 0.43 | 1.36 ± 0.28 |
| DM             | 12 | 314.71 ± 6.05 | 19.53 ± 0.36 | 0.90 ± 0.16 | 2.51 ± 0.38 | 2.01 ± 0.36 |
| <i>t</i> value |    | 12.520        | 77.942       | 4.704       | 8.665       | 3.378       |
| <i>P</i> value |    | 0.000         | 0.000        | 0.000       | 0.000       | 0.000       |

DM, diabetes mellitus, 糖尿病; FBG, fasting blood glucose, 空腹血糖; FSI, fasting serum insulin, 空腹血清胰岛素; TG, triglyceride, 甘油三酯; TC, total cholesterol, 总胆固醇

**表 2** 不同处理组大鼠各观察时间点 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的比较( $\bar{x} \pm s, s$ )

**Table 2.** Comparison of Morris water maze test escape latency at different time points among 4 groups ( $\bar{x} \pm s, s$ )

| Group    | N | 1 d          | 2 d          | 3 d          | 4 d          | 5 d          |
|----------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Control  | 6 | 53.40 ± 3.87 | 25.99 ± 4.10 | 27.50 ± 4.39 | 20.34 ± 3.69 | 11.35 ± 3.95 |
| DM       | 6 | 58.75 ± 3.60 | 41.79 ± 3.77 | 32.63 ± 4.35 | 33.63 ± 3.45 | 20.63 ± 4.41 |
| CCH      | 6 | 56.70 ± 4.32 | 38.79 ± 3.56 | 34.63 ± 3.25 | 29.21 ± 3.63 | 21.43 ± 4.39 |
| DM + CCH | 6 | 61.60 ± 3.50 | 54.60 ± 3.75 | 45.39 ± 2.78 | 39.71 ± 3.47 | 41.43 ± 4.48 |

DM, diabetes mellitus, 糖尿病; CCH, chronic cerebral hypoperfusion, 慢性脑低灌注

**表 3** 不同处理组大鼠各观察时间点 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期重复测量设计的方差分析表

**Table 3.** The ANOVA for repeated measurement design at each observation time point among 4 groups

| Source of variation | SS         | df | MS         | F value | P value |
|---------------------|------------|----|------------|---------|---------|
| Treatment           | 6 439.962  | 3  | 2 146.654  | 8.171   | 0.001   |
| Time                | 14 322.150 | 1  | 14 322.150 | 424.972 | 0.000   |
| Treatment × time    | 388.517    | 3  | 129.506    | 3.843   | 0.025   |
| Error among groups  | 5 254.438  | 20 | 262.722    |         |         |
| Error within group  | 674.028    | 20 | 33.701     |         |         |

**表 4** 不同处理组大鼠 Morris 水迷宫实验第 6 天空间探索实验目标象限游泳时间百分比的比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

**Table 4.** Comparison of percentage of target quadrant time on the 6th day of Morris water maze test among different groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| Group    | N | Percentage   | F value | P value |
|----------|---|--------------|---------|---------|
| Control  | 6 | 43.69 ± 3.22 |         |         |
| DM       | 6 | 35.84 ± 3.15 | 8.454   | 0.001   |
| CCH      | 6 | 36.74 ± 3.19 |         |         |
| DM + CCH | 6 | 22.38 ± 3.41 |         |         |

DM, diabetes mellitus, 糖尿病; CCH, chronic cerebral hypoperfusion, 慢性脑低灌注。The same as Table 5-6

灌注组大鼠海马 BACE-1 阳性神经元数目减少、分布稀疏,染色较浅(图 1)。Western blotting 法显示, DM + CCH 组大鼠海马神经元 BACE-1 表达水平升高( $P = 0.005$ ),且高于对照组( $P = 0.024$ )、糖尿病组( $P = 0.011$ )和慢性脑低灌注组( $P = 0.001$ ,表 6)。

### 讨 论

有研究显示,慢性脑低灌注引起的进行性认知损害和长时程记忆障碍可于双侧颈总动脉永久性结扎后 3~6 个月方显现<sup>[9]</sup>,单纯糖尿病引起的空间学习记忆能力障碍亦出现在 3 个月后<sup>[10]</sup>。本研究在 2 型糖尿病的基础上行双侧颈总动脉永久性结扎,使大鼠处于慢性脑缺血状态, Morris 水迷宫实验显示, DM + CCH 组大鼠出现行为学异常改变,逃避潜伏期明显延长、目标象限游泳时间百分比缩短,

呈现明显的空间学习记忆能力障碍,而糖尿病组和慢性脑低灌注组大鼠则与对照组之间无明显差异。提示 2 型糖尿病可加重慢性脑低灌注引起的空间学习记忆能力障碍。

BACE-1 是形成  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ ) 的主要剪切酶<sup>[11]</sup>,而近年研究表明, BACE-1 并非单纯促进 A $\beta$  生成,在其他诱发记忆障碍之发病机制中亦具有重要病理作用,从而导致学习和记忆障碍<sup>[12]</sup>。本研究糖尿病伴慢性脑低灌注组大鼠海马神经元 BACE-1 表达水平明显升高,与行为学测验结果相一致。鉴于此,我们推测 BACE-1 表达升高参与糖尿病-慢性脑低灌注大鼠记忆障碍过程,对其引起的认知损害具有病理学意义,但其发挥作用的途径尚待进一步研究加以证实。

本研究首次将 2 型糖尿病模型与慢性脑低灌模



**表 5** 不同处理组大鼠可视平台实验到达平台时间的比较( $\bar{x} \pm s, s$ )

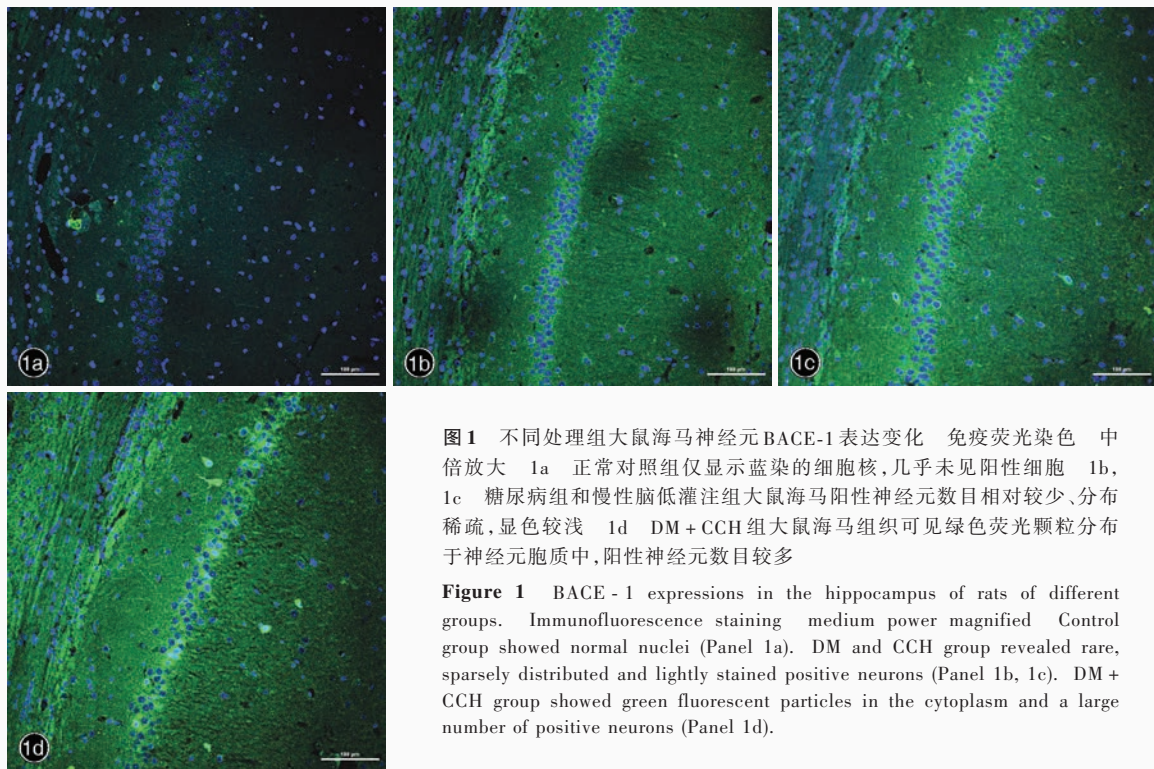
**Table 5.** Comparison of time to reach the platform in visual experiment among 4 groups ( $\bar{x} \pm s, s$ )

| Group    | N | Time         | F value | P value |
|----------|---|--------------|---------|---------|
| Control  | 6 | 11.42 ± 3.84 |         |         |
| DM       | 6 | 16.06 ± 2.98 | 0.938   | 0.441   |
| CCH      | 6 | 15.95 ± 3.45 |         |         |
| DM + CCH | 6 | 19.80 ± 3.81 |         |         |

**表 6** 不同处理组大鼠海马神经元 BACE-1 相对表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 6.** Comparison of relative expression of BACE-1 in the hippocampus of rats among 4 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group    | N | Relative value | F value | P value |
|----------|---|----------------|---------|---------|
| Control  | 6 | 0.06 ± 0.02    |         |         |
| DM       | 6 | 0.16 ± 0.03    | 5.631   | 0.005   |
| CCH      | 6 | 0.18 ± 0.03    |         |         |
| DM + CCH | 6 | 0.23 ± 0.04    |         |         |



**图 1** 不同处理组大鼠海马神经元 BACE-1 表达变化 免疫荧光染色 中倍放大 1a 正常对照组仅显示蓝染的细胞核,几乎未见阳性细胞 1b, 1c 糖尿病组和慢性脑低灌注组大鼠海马阳性神经元数目相对较少、分布稀疏,显色较浅 1d DM + CCH 组大鼠海马组织可见绿色荧光颗粒分布于神经元胞质中,阳性神经元数目较多

**Figure 1** BACE - 1 expressions in the hippocampus of rats of different groups. Immunofluorescence staining medium power magnified Control group showed normal nuclei (Panel 1a). DM and CCH group revealed rare, sparsely distributed and lightly stained positive neurons (Panel 1b, 1c). DM + CCH group showed green fluorescent particles in the cytoplasm and a large number of positive neurons (Panel 1d).

型相结合,观察二者相互作用对模型大鼠认知功能的影响,以及相关病理改变和可能机制。表明 2 型糖尿病伴慢性脑低灌注可加重大鼠空间学习记忆能力障碍,可能与 BACE-1 表达水平升高相关,为临床治疗 2 型糖尿病伴慢性脑低灌注所致认知损害提供了实验室依据。

参 考 文 献

[1] Valério Romanini C, Dias Fiuza Ferreira E, Correia Bacarin C, Verussa MH, Weffort de Oliveira RM, Milani H. Neurohistological and behavioral changes following the four-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion: comparison between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*, 2013, 252:214-221.  
 [2] Sekita A, Kiyohara Y. Lifestyle-related diseases as risk factors for dementia. *Brain Nerve*, 2010, 62:709-717.

[3] Clegg DJ, Gotoh K, Kemp C, Wortman MD, Benoit SC, Brown LM, D'Alessio D, Tso P, Seeley RJ, Woods SC. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol Behav*, 2011, 103:10-16.  
 [4] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*, 2005, 52:313-320.  
 [5] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res*, 1994, 653:231-236.  
 [6] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, 2006, 1:848-858.  
 [7] Valentim LM, Michalowski CB, Gottardo SP, Pedrosa L, Gestrich LG, Netto CA, Salbego CG, Rodnigh R. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunocontent in rat hippocampus. *Neuroscience*, 1999, 91:1291-1297.

- [8] Zhang T, Pan BS, Zhao B, Zhang LM, Huang YL, Sun FY. Exacerbation of poststroke dementia by type 2 diabetes is associated with synergistic increases of beta-secretase activation and beta-amyloid generation in rat brains. *Neuroscience*, 2009, 161:1045-1056.
- [9] Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, Elsner VR, Ben J, da Costa MS, Mestriner R, Weis SN, Netto CA. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull*, 2012, 87:109-116.
- [10] Reisi P, Alaei H, Babri S, Sharifia MR, Mohaddesd G. Effects of treadmill running on spatial learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett*, 2009, 455:79-83.
- [11] Parsons RB, Austen BM. Protein-protein interactions in the assembly and subcellular trafficking of the BACE (beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) complex of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35:974-979.
- [12] Chen Y, Huang X, Zhang YW, Rockenstein E, Bu G, Golde TE, Masliah E, Xu H. Alzheimer's  $\beta$ -secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of  $\beta$ -amyloid. *J Neurosci*, 2012, 32:11390-11395.

(收稿日期:2014-04-17)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国现代神经疾病杂志》编辑部关于稿件参考文献的要求

《中国现代神经疾病杂志》编辑部对来稿的参考文献一律按照 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录,依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。尽量避免引用摘要作为参考文献。内部刊物、未发表资料、个人通信等请勿作为文献引用。每条参考文献著录项目应齐全,不得用“同上”或“ibid”表示。参考文献中的主要责任者(专著作者、论文集主编、学位申报人、专利申请人、报告撰写人、期刊文章作者、析出文章作者)均全部列出。外文期刊名称用缩写,以 *Index Medicus* 中的格式为准,中文期刊用全名。每条参考文献均须著录起止页码。中英文双语形式著录时,文献序号后先列出完整的中文文献英译文,再列出中文文献。作者姓名的英译文采用汉语拼音形式表示,姓大写,名用缩写形式,取每个字的首字母,大写。期刊名称以汉语拼音注录。

(1) 期刊著录格式:主要责任者. 题名. 刊名, 年, 卷:起页-止页。

举例:[1] Gao S. Ten-year advance of transcranial Doppler ultrasonography. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2010, 10:127-136.[高山. 经颅多普勒超声十年进展. *中国现代神经疾病杂志*, 2010, 10:127-136.]

(2) 著作或编著著录格式:主要责任者. 题名: 其他题名信息. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(第 1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 引文起页-止页。

举例:[2] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system, 4th ed. Li Q, Xu QZ, Trans. Beijing: Editorial Office of Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2011: 249-252.[Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. 中枢神经系统肿瘤 WHO 分类. 4 版. 李青, 徐庆中, 译. 北京: 诊断病理学杂志社, 2011: 249-252.]

(3) 电子文献著录格式:必须于题名后著录[文献类型标志/文献载体标志],一般同时于起页-止页后著录[引用日期]以及获取和访问路径。

举例:[3] Foley KM, Gelband H. Improving palliative care for cancer[M/OL]. Washington: National Academy Press, 2001 [2002-07-09]. <http://www.nap.edu/books/0309074029/html>.

## 《中国现代神经疾病杂志》开辟网络视频模块

《中国现代神经疾病杂志》新开辟网络视频模块。当期重点号为神经外科专题时,专题论著均为手术操作性文章,为了使广大读者能够更为直观地观摩,并满足一些希望学习手术操作技巧临床医师的需求,编辑部特开辟网络视频模块(Medical Video),邀请每篇论著作者提供相应手术视频,同时配备简要的手术方法介绍(中英文对照形式),上传至我刊网站([www.cjenn.org](http://www.cjenn.org)),供广大神经外科医师观看、学习。同期出版的纸版杂志在每篇文章手术方法后括号内标注访问路径,可以直接点击我刊网站 Medical Video 模块观看视频,也可在线阅读文章时点击超链接观看视频。

网络视频是《中国现代神经疾病杂志》新开辟的模块,经验尚浅,希望得到广大作者和读者的意见反馈,使我们能够不断完善此项工作,真正能够为我国的神经外科事业作一点贡献!期待您的支持!