

· 基础研究 ·

高压氧对 A β 25-35 诱导大鼠认知和记忆障碍及其海马神经元凋亡的影响

田小强 张丽 杨琳 黄平 钱霞 黄培林 张丽达

【摘要】目的 探讨高压氧(HBO)治疗对 β -淀粉样蛋白(A β)25-35 所致拟阿尔茨海默病(AD)模型大鼠认知和记忆功能的改变及其海马神经元凋亡情况的影响。**方法** 选取健康成年雄性 Sprague Dawley (SD)大鼠 48 只,按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、模型组和 HBO 治疗组,每组 12 只。正常对照组不做任何处理。其余各组大鼠给予 10% 水合氯醛(4 ml)腹腔注射麻醉,假手术组大鼠每侧海马注射 5 μ l 生理盐水;造模大鼠(模型组和 HBO 治疗组)每侧海马注射 5 μ l 的 A β 25-35 制备拟 AD 大鼠痴呆模型。造模成功后,模型组大鼠不做任何治疗处理;HBO 治疗组大鼠造模 2 周后,常规 HBO 治疗,每日 1 次,10 d 为 1 个疗程,中间休息 3 d,共 2 个疗程。采用 Morris 水迷宫法观察各组大鼠空间记忆能力的改变,TUNEL 染色观察大鼠海马神经元凋亡情况的改变,同时检测海马组织凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA、蛋白表达的改变。**结果** 水迷宫实验中,第 5 天和第 6 天 HBO 治疗组大鼠的逃避潜伏期与模型组比较显著缩短[(33.4 $\pm$ 4.5)s 比(48.1 $\pm$ 2.7)s,(20.8 $\pm$ 1.7)s 比(40.5 $\pm$ 1.9)s, $P < 0.05$],空间探索实验中 HBO 治疗组大鼠在原平台所在象限的时间及穿过原平台的次数较模型组显著增加[(35.8 $\pm$ 5.6)% 比(21.1 $\pm$ 3.8)%, (4.8 $\pm$ 1.1)次比(3.1 $\pm$ 1.2)次, $P < 0.05$]。TUNEL 染色中,模型组海马神经元中胞核呈现棕色凋亡形态的较多,而 HBO 治疗组则见少数凋亡的海马神经元。海马组织凋亡基因检测中,HBO 治疗组 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达显著高于模型组($P < 0.05$),其 Bax mRNA 和蛋白的表达则相应地降低。**结论** HBO 可能通过抑制 A β 25-35 诱导的海马神经元凋亡而改善 AD 大鼠模型的认知和记忆能力。

【关键词】 阿尔茨海默氏病; 高压氧; β -淀粉样蛋白; 细胞凋亡

A possible anti-apoptosis mechanism of hyperbaric oxygen in rats with memory impairments induced by A β 25-35 Tian Xiaoqiang*, Zhang Li, Yang Lin, Huang Ping, Qian Xia, Huang Peilin, Zhang Lida.

* Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: Zhang Lida, Email: 13951940316@163.com

【Abstract】 Objective To explore the possible protective effect of hyperbaric oxygen (HBO) on cognitive deficits induced by amyloid β 25-35 (A β 25-35) and neuronal apoptosis in the hippocampi of rats with Alzheimer's disease (AD). **Methods** The animal AD model was established in 24 Sprague-Dawley rats by bilateral hippocampal injection of A β 25-35. Twelve rats were injected with normal saline as controls, and another 12 served as normal controls. After the injection, the model rats were further divided into a model group and a treatment group. All the rats were housed with normal feeding for 2 weeks and then those in the treatment groups received a total of 2 courses of HBO treatment (10 days each with an interval of 3 days in between). The other groups were left with no treatment. After the treatment, the rats' learning and memory ability were tested using Morris' water maze test, and any neuronal changes were observed using TUNEL staining. The expression of mRNA and Bcl-2 and Bax proteins in the hippocampus were detected using a RT-PCR and Western blotting. **Results** HBO significantly improved the learning and memory impairment and alleviated neuronal apoptosis in the hippocampus compared against the control group. In addition, HBO treatment significantly increased the mRNA and protein expression of Bcl-2 and down-regulated the expression of Bax. **Conclusion** HBO treatment can prevent learning and memory impairment induced by A β 25-35 peptides, which might be mediated by inhibiting neuronal apoptosis in the hippocampus.

【Key words】 Alzheimer's disease; Hyperbaric oxygen; β -amyloids; Apoptosis

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.01.003

基金项目:南京市社会发展科技计划(200804039);南京市医学科技发展重点项目资助(ZKX13034)

作者单位:210009 南京,东南大学附属第二医院肿瘤内科(田小强);南京医科大学附属脑科医院老年科(张丽);东南大学医学院病理学系(杨琳、黄培林);东南大学附属中大医院高压氧科(黄平、钱霞、张丽达)

通信作者:张丽达,Email:13951940316@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种渐进性的慢性退行性神经致死性疾病,其神经病理学特点主要是 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)的过度沉积和神经元纤维缠结(neuro-fibrillary tangles, NFTs)^[1]。AD 患者临床表现为认知和记忆功能不断恶化,日常生活能力进行性减退,并伴有各种神经精神症状和行为障碍。A β 在海马和颞叶皮质的过度沉积被认为是 AD 的发病机制中的早期事件^[2]。A β 25-35 具有与 A β 全长有同样神经细胞毒性^[3]的一小肽段,它能够诱发氧化应激产生和损伤空间学习和记忆能力,同时伴海马神经元细胞凋亡^[4]。

高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗可降低缺血再灌注引起的氧化损伤^[5],在创伤性脑损伤的治疗中发挥着神经保护作用^[6]。虽然过度 HBO 治疗可能会通过刺激活性氧(reactive oxygen species, ROS)的形成而产生毒性^[7],但研究发现, HBO 治疗具有抗氧化应激^[8]、阻止神经细胞凋亡^[9]的作用。本研究通过大鼠海马注射凝聚态的 A β 25-35 建立大鼠拟 AD 模型,观察 HBO 治疗对拟 AD 模型大鼠认知和记忆功能以及其凋亡蛋白的影响,旨在探讨 HBO 治疗 AD 的可行性。

材料与方法

一、实验动物、仪器和试剂

健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只(购自上海斯莱克动物中心),体重 220 ~ 250 g,实验前适应性饲养 1 周。脑立体定位仪:SR-5R 日本成茂;医用 HBO 舱:SHC3200-8500 型,上海 701 所;水迷宫:淮北正华,NO. ZH0065。A β 25-35:美国 Sigma 公司,溶解于无菌生理盐水中(1 g/L),37 °C 孵育 7 d。TUNEL 凋亡试剂盒:罗氏生物公司。RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒均购自大连 TAKARA 公司。GAPDH、Bcl-2、Bax 引物用 Primer 5.0 自行设计,由上海捷瑞生物工程有限公司合成。总蛋白提取试剂盒及 BSA 蛋白定量测定试剂盒均购自北京碧云天生物技术公司。兔来源 GAPDH、Bcl-2、Bax 单克隆一抗及羊抗兔 HRP 二抗均购自美国 CST 公司。ECL 发光液购自北京博奥森生物技术有限公司。

二、动物实验分组及模型制备

实验分组:将 48 只实验大鼠按随机数字表法分为正常对照组(不造模)、假手术组(每侧海马注射 5 μ l 生理盐水)、模型组(每侧海马注射 5 μ l 的 A β 25-35)和 HBO 治疗组(每侧海马注射 5 μ l 的 A β 25-35, HBO 处理),每组 12 只。实验期间每组给予常规清洁饮食,保持恒温。

模型制备:正常对照组不做任何处理,常规饲养。

其余各组大鼠给予 10% 水合氯醛(4 ml)腹腔注射麻醉,将大鼠以前齿与双内耳水平面固定于脑立体定位仪上。颅顶部备皮,常规消毒手术区域皮肤,沿颅顶中线做 1 cm 纵行切口,止血,钝性分离骨膜。参照大鼠脑图谱^[10]对双侧海马进行定位:前囟点为零点,向后 3 mm(A = -3 mm),双侧旁开 2 mm(L = 2 mm; R = 2 mm),深 3 mm(H = 3 mm)。眼科钻在定位处打孔,用 5 μ l 微量注射器垂直骨面扎入颅骨,进针深度为 3 mm。假手术组大鼠每侧海马注射 5 μ l 生理盐水;造模大鼠(模型组和 HBO 治疗组)每侧海马注射 5 μ l 的 A β 25-35 制作 AD 模型大鼠,缓慢进针,注射时间 5 min,留针 5 min,缓慢退出;然后局部消毒,缝合皮肤,连续 3 d 腹腔注射青霉素预防感染。模型组大鼠造模成功后,不做任何治疗处理;HBO 治疗组大鼠于 A β 25-35 注射 2 周后行 HBO 治疗处理。

三、HBO 治疗方法

HBO 治疗方法:采用医用 HBO 舱(上海产, SHC3200-8500 型),给予 2 ATA(1 ATA = 100 kPa)纯氧,加压和减压各 15 min,稳压 30 min,吸氧时间共 60 min,每日 1 次,10 d 为 1 个疗程,中间休息 3 d,共 2 个疗程。

四、Morris 水迷宫实验

采用 Morris 水迷宫法观察各组大鼠空间记忆能力的改变。HBO 治疗结束后,分别对各组大鼠行 Morris 水迷宫检测。Morris 水迷宫圆形,划分 4 个象限(I、II、III 和 IV),直径 160 cm,水面深度 40 cm。平台直径 15 cm,置于象限 I 的中心,藏匿于水面下 2 cm,水温保持 23 ~ 25 °C。实验在较暗的环境中进行,尽量减少声响及灯光的影响。在水迷宫 II 和 III 象限的池壁做标记,作为大鼠入水点,此点固定。测定时,将大鼠面向池壁从 2 个入水点分别放入水池,记录大鼠从入水到找到水下隐蔽平台并站立于其上所需时间即逃避潜伏期(escape latency)及其游泳速度,大鼠找到平台后,让其在平台上站立 10 s。若入水后 90 s 大鼠未能找到平台,则将其轻轻从水中引导到平台上,并停留 10 s(该次成绩记做 90 s),然后进行下一次训练。每只大鼠从 2 个入水点分别放入水池为 1 次训练,2 次训练之间间隔 30 s,连续 6 d。第 7 天,进行空间探索实验,此时撤去平台,每只大鼠在象限 III 释放点释放,记录其在 90 s 内在象限 I(原平台所在象限)游泳的时间占总时间的百分比及其穿越原平台的次数。

五、TUNEL 检测

水迷宫测试结束后,将大鼠用($n = 6$, 每组)10% 水合氯醛(4 ml/kg)腹腔注射麻醉快速开胸,经左心室主动脉插管,以 200 ml 冷生理盐水快速冲洗后,4% 多

聚甲醛固定液 500 ml 缓慢灌注固定。除去颅盖,取出完整大脑组织,用上述固定液固定 48 h 后,自颅顶部前囟点向后取材 2~4 mm,常规脱水,石蜡包埋,作连续冠状切片,切片厚 5 μ m。常规脱蜡,进行 TUNEL 染色,具体步骤见试剂盒说明书,然后镜下观察海马神经元的形态改变状况。

六、RT-PCR 和 Western Blot 检测大鼠海马组织 Bcl-2 和 Bax mRNA 及蛋白表达情况

水迷宫测试结束后,每组剩余大鼠($n=6$,每组)腹腔麻醉、处死、快速取脑,剥离海马组织,液氮保存,用时取出。取一定量海马组织,参照试剂盒说明书进行总 RNA 提取。总 RNA 提取后,在 260 nm 处的吸光度测定 RNA 的浓度。逆转录和 PCR 步骤均按照说明书进行操作。PCR 反应引物序列如下:Bcl-2 上游 5'-GGCATCTTCTCCTTCCAG-3';下游引物 5'-ATCCCAGCCTCCGTTAT-3'。Bax 上游 5'-CATCCAG-GATCGAGCAGAG-3';下游引物 5'-GAGGACTC-CAGCCACAAAG-3'。GAPDH 上游 5'-TTGCCCTCT-TCTACTTTGC-3';下游引物 5'-AGCCTTGACTGTGC-CATT-3。反应条件如下:预变性 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 1 个循环;95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。反应结束后,PCR 产物经 3% 琼脂糖凝胶上电泳,用溴化乙锭染色,紫外光下观察,使用 ImageJ 软件分析相对光密度。

取一定量海马组织参照试剂盒说明书进行总蛋白。细胞裂解液匀浆上清经 BSA 蛋白试剂盒测定总蛋白浓度后进行 Western blot 分析。以 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,半干电转移法转移至 PVDF 膜,室温下用脱脂牛奶封闭 1 h 后分别加入一抗(Bcl-2,

Bax 和 GAPDH,均为 1:1000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,第二天用羊抗兔二抗(1:5000 稀释)室温孵育 1 h,化学发光法显色,X 线底片曝光。GAPDH 作为内参照。实验重复 5 次。

七、统计学方法

使用 SPSS 17.0 版统计软件进行统计学分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示。在 Morris 水迷宫中各组间比较采用重复测量的方差分析(ANOVA),其余采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、HBO 治疗对模型大鼠空间学习和记忆障碍的影响

各组大鼠的逃避潜伏期随着实验的进行而缩短,其中第 5 天和第 6 天 HBO 治疗组的逃避潜伏期与模型组比较显著缩短[(33.4 $\pm$ 4.5) s 比 (48.1 $\pm$ 2.7) s, (20.8 $\pm$ 1.7) s 比 (40.5 $\pm$ 1.9) s, $P < 0.05$],但与正常对照组和假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

各组大鼠的游泳速度之间比较,差异并无统计学意义($P > 0.05$),从而排除了因运动障碍引起的误差。详见表 2。

在第 7 天的空间探索实验中,HBO 治疗组在原平台象限所占的时间百分比为(35.8 $\pm$ 5.6)%,与模型组(21.1 $\pm$ 3.8)%比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);且 HBO 治疗组大鼠穿过原平台的次数也明显高于模型组($P < 0.05$);而 HBO 治疗组与正常对照组和假手术组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 3。

表 1 各组实验大鼠在 Morris 水迷宫实验中的逃避潜伏期比较(s, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
正常对照组	12	85.3 $\pm$ 4.6	63.3 $\pm$ 3.3	57.3 $\pm$ 3.7	47.5 $\pm$ 3.4	27.7 $\pm$ 2.9 ^a	16.7 $\pm$ 1.6 ^a
假手术组	12	82.8 $\pm$ 2.8	61.4 $\pm$ 10.5	58.5 $\pm$ 5.1	43.9 $\pm$ 2.9	28.9 $\pm$ 4.7 ^a	17.9 $\pm$ 2.1 ^a
模型组	12	85.3 $\pm$ 4.3	82.1 $\pm$ 2.9	66.5 $\pm$ 5.3	58.1 $\pm$ 7.6	48.1 $\pm$ 2.7	40.5 $\pm$ 1.9
HBO 治疗组	12	82.1 $\pm$ 2.2	70.3 $\pm$ 4.3	61.6 $\pm$ 4.5	53.5 $\pm$ 7.1	33.4 $\pm$ 4.5 ^a	20.8 $\pm$ 1.7 ^a

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$

表 2 各组实验大鼠在 Morris 水迷宫实验中的平均游泳速度(cm/s, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
正常对照组	12	24.1 $\pm$ 3.5	22.2 $\pm$ 5.1	24.8 $\pm$ 2.7	23.2 $\pm$ 6.3	25.2 $\pm$ 5.6	24.3 $\pm$ 2.9
假手术组	12	23.2 $\pm$ 2.3	24.6 $\pm$ 3.6	27.9 $\pm$ 5.4	25.9 $\pm$ 5.1	26.2 $\pm$ 6.3	25.3 $\pm$ 6.2
模型组	12	22.7 $\pm$ 4.2	25.6 $\pm$ 4.6	26.3 $\pm$ 6.2	22.9 $\pm$ 4.8	26.7 $\pm$ 2.8	26.7 $\pm$ 5.8
HBO 治疗组	12	23.5 $\pm$ 4.6	23.8 $\pm$ 5.6	26.6 $\pm$ 5.8	22.1 $\pm$ 3.5	22.7 $\pm$ 4.9	22.1 $\pm$ 3.9

表 3 各组大鼠在空间探索实验中的空间记忆情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	原平台象限时间 百分比(%)	穿越原平台 位置次数(次)
正常对照组	12	43.2 ± 5.1 ^a	5.7 ± 1.5 ^a
假手术组	12	41.6 ± 4.6 ^a	5.6 ± 1.3 ^a
模型组	12	21.1 ± 3.8	3.1 ± 1.2
HBO 治疗组	12	35.8 ± 5.6 ^a	4.8 ± 1.1 ^a

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$

二、TUNEL 染色观察 HBO 治疗对模型大鼠海马神经元凋亡的影响

镜下可见,正常对照组和假手术组的海马神经元均未见棕黄色沉淀存在;而模型组中胞核为棕黄色沉淀的海马神经元较多,代表凋亡的海马神经元,其数量显著多于 HBO 治疗组,详见图 1。

三、HBO 治疗对模型大鼠海马组织 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响

各组大鼠海马组织中 Bcl-2 和 Bax mRNA 的相对表达量:与模型组比较,HBO 治疗组大鼠的 Bcl-2 mRNA 表达显著上调(图 2),而 Bax mRNA 表达明显下调(图 3),且经统计学分析比较,差异均有统计学意义

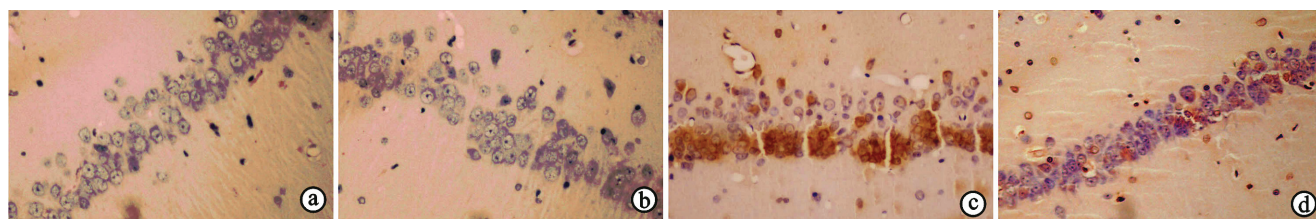
($P < 0.05$);HBO 治疗组分别与正常对照组和假手术组比较,组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

四、HBO 治疗对模型大鼠海马组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

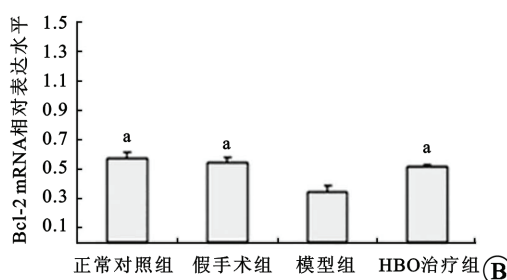
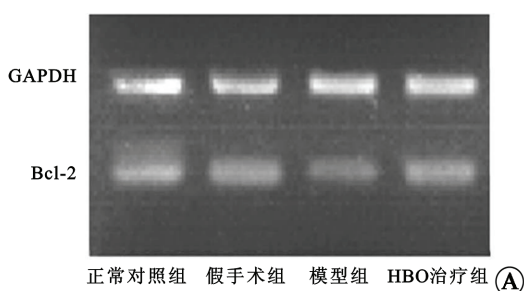
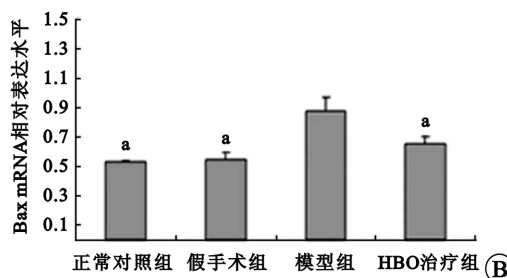
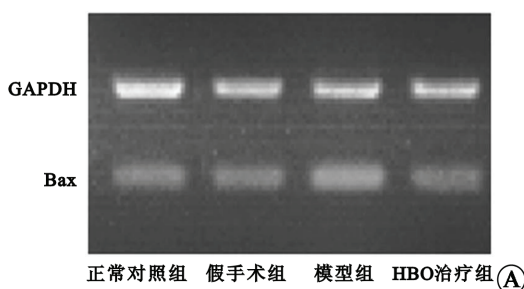
各组大鼠海马组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的相对表达量:与模型组比较,HBO 治疗组大鼠的 Bcl-2 蛋白的表达显著增加(图 4),而 Bax 蛋白的表达则表现出相反的趋势(图 5),且组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);HBO 治疗组分别与正常对照组和假手术组比较,组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

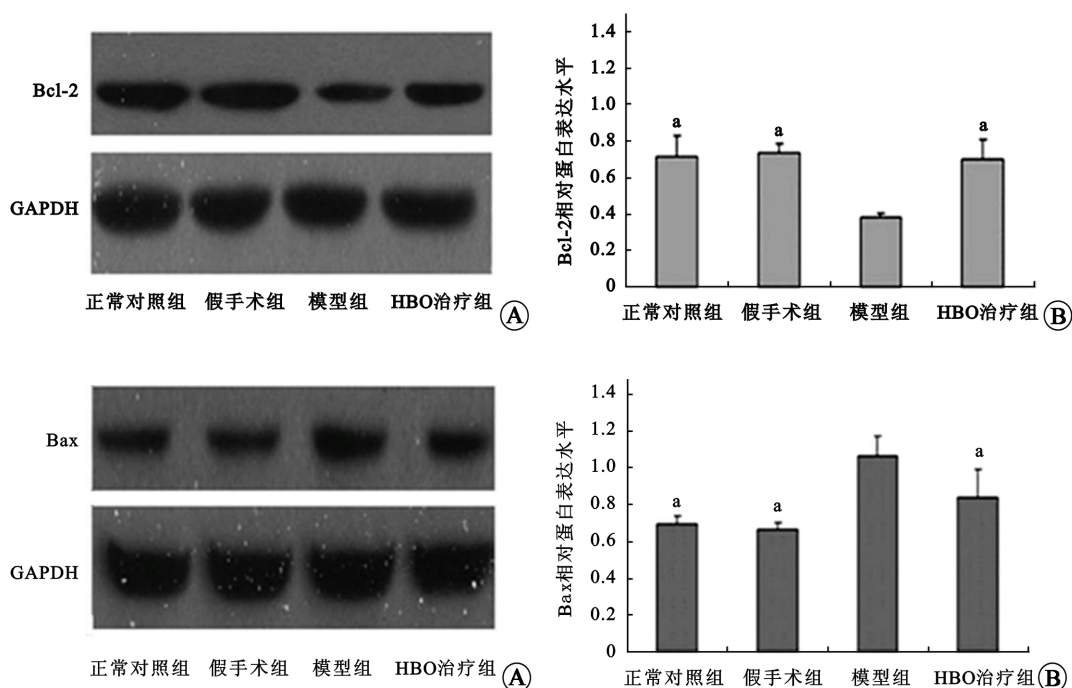
讨 论

海马在学习和记忆过程中发挥着关键作用^[11],在人类伴有神经功能障碍和退变的遗忘疾病中,海马神经元的损害是一个非常重要的原因,而海马神经元的受损在 AD 患者认知功能损伤中同样非常重要。本研究发现,AD 大鼠模型在经过 HBO 处理后,与模型组比较,其逃避潜伏期在第 5 天和第 6 天显著减少,同时空间探索实验也发现该组大鼠对于原平台位置及所在象



注:a 为正常对照组;b 为假手术组;c 为模型组;d 为 HBO 治疗组

图 1 各组 AD 大鼠海马神经元凋亡情况镜下观(TUNEL 染色, ×200)注:A 为电泳图;B 为 mRNA 相对表达量示意图;与模型组比较,^a $P < 0.05$ **图 2** HBO 治疗对模型大鼠海马组织中 Bcl-2 mRNA 表达的影响注:A 为电泳图;B 为 mRNA 相对表达量示意图;与模型组比较,^a $P < 0.05$ **图 3** HBO 治疗对模型大鼠海马组织中 Bax mRNA 表达的影响



注: A 为电泳图; B 为蛋白相对表达量示意图; 与模型组比较, ^a $P < 0.05$

图 4 HBO 治疗对模型大鼠海马组织中 Bcl-2 蛋白表达的影响

注: A 为电泳图; B 为蛋白相对表达量示意图; 与模型组比较, ^a $P < 0.05$

图 5 HBO 治疗对模型大鼠海马组织中 Bax 蛋白表达的影响

限的记忆能力显著增加;而海马神经元 TUNEL 染色显示, HBO 治疗组大鼠海马 CA1 亚区神经元凋亡数目明显减少,而海马 CA1 亚区的凋亡神经元在模型组普遍可见,提示 AD 模型组大鼠学习和记忆能力的降低可能与海马神经元受损有关,而 HBO 治疗则可以通过改善受损海马神经元的凋亡从而提高 AD 模型大鼠的空间学习和记忆能力。

本研究同时探讨了各组大鼠海马组织中凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达情况,结果显示, HBO 能够显著增加 AD 大鼠模型海马组织中 Bcl-2 基因和蛋白的表达,同时抑制 Bax 基因和蛋白的表达,提示 HBO 能够通过调控凋亡相关基因的表达来发挥其抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导海马神经元凋亡的作用。

本研究结果表明, $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 模型大鼠的海马神经元凋亡能够被 HBO 逆转,从而改善因海马神经元凋亡而导致的大鼠空间记忆能力的降低,这就为临床上应用 HBO 治疗 AD 提供了一定的理论基础。但 HBO 疗法在保护 AD 模型大鼠的海马神经元过程中是否还有其它机制参与,有待于进一步更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Vickers JC, Dickson TC, Adlard PA, et al. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease[J]. Prog Neurobiol, 2000, 60(2): 139-165.
- [2] Pan YF, Chen XR, Wu MN, et al. Arginine vasopressin prevents against

$A\beta_{25-35}$ -induced impairment of spatial learning and memory in rats[J]. Horm Behav, 2010, 57(4-5): 448-454.

- [3] Klementiev B, Novikova T, Novitskaya V, et al. A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by $A\beta_{25-35}$ [J]. Neuroscience, 2007, 145(1): 209-224.
- [4] Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, et al. Amyloid-beta (25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus[J]. Physiol Behav, 2004, 80(5): 647-655.
- [5] Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. Pathophysiology, 2006, 13(3): 195-208.
- [6] Praticò D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal[J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(12): 609-615.
- [7] Bastianetto S, Ramassamy C, Doré S, et al. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(6): 1882-1890.
- [8] Wang YC, Zhang S, Du TY, et al. HBO preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by stimulating autophagy in neurocyte[J]. Brain Res, 2010, 1323(1): 149-151.
- [9] Wang GH, Zhang XG, Jiang ZL, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment on traumatic brain injury in the rat[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(9): 1733-1743.
- [10] 宋娟, 高晓平. 脑缺血致学习记忆功能障碍机制的研究进展[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(1): 67-69.
- [11] Bussièrre T, Giannakopoulos P, Bouras C, et al. Progressive degeneration of nonphosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: stereologic analysis of prefrontal cortex area 9[J]. J Comp Neurol, 2003, 463(3): 281-302.

(修回日期: 2013-09-28)

(本文编辑: 汪 玲)