

• 专题研究 •

 β -淀粉样肽对小鼠海马神经发生的影响及中药的干预作用

张孟仁 左萍萍 李学坤 孔令娜 郭赛珊

[摘要] 目的 观察 $A\beta_{25-35}$ 对痴呆小鼠模型海马神经发生的影响及中药“脑复聪”的干预作用。方法 脑室内注射 $A\beta_{25-35}$ 造成痴呆模型小鼠。用 Morris 水迷宫测空间学习记忆功能;同位素配基受体结合活性;BrdU 标记的免疫组化检测神经发生。结果 模型小鼠的学习记忆功能降低($P < 0.05$);海马 NMDA 受体结合活性显著升高而胆碱能 M 受体结合活性显著降低($P < 0.001$);海马齿状回 BrdU 阳性细胞减少($P < 0.05$)。经“脑复聪”治疗后上述变化均得到改善($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.05$)。结论 $A\beta_{25-35}$ 的神经毒机理包括对神经发生的抑制作用;提高神经发生率可能是中药治疗神经退行性疾病的重要机理之一。

[关键词] β -淀粉样肽;神经发生;海马;中药

Effects of β Amyloid peptide on neurogenesis in brain hippocampus of mice and interfering effect of traditional Chinese medicine ZHANG Men-ren, ZUO Ping-ping, LI Xue-kun, et al. Institute of Basic Medical Sciences, Beijing Union Hospital, Beijing 100005, China

[Abstract] **Objective** To observe the changes of neurogenesis in the hippocampus of Alzheimer's model mice and the effect of traditional Chinese medicine Nao Fu Cong. **Methods** Alzheimer's type dementia of mice was induced by $A\beta_{25-35}$ icv. Space learning and memorial ability were tested with Morris Water Maze. The activity of NMDA and M receptor were measured with radio-ligand of [3 H]MK-801 and [3 H]QNB. Neurogenesis was observed with the BrdU immunohistochemistry. **Results** Space learning and memorial ability significantly decreased($P < 0.05$), [3 H]MK-801 binding increased and [3 H]QNB binding decreased($P < 0.001$), BrdU positive cells decreased in hippocampus($P < 0.05$). After given drugs for 2 weeks, the mentioned changes were improved significantly($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.05$). **Conclusions** The toxic effect of $A\beta_{25-35}$ was involved with the inhibitory action of neurogenesis. Promoting the neurogenesis may be one of the mechanism of traditional Chinese medicine to treat the neurodegenerative diseases.

[Key words] β Amyloid peptide; neurogenesis; hippocampus; traditional Chinese medicine

中图分类号:R743.9, R277.7 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)07-0390-03

近年发现,成年哺乳类动物的神经干细胞通过增殖、分化产生新的神经细胞,这些新生的神经细胞能够整合到脑内已有的神经回路建立突触联结,参与脑功能的修复与重建^[1]。在衰老^[2]或某些神经退行性病变动物模型^[3]中神经发生出现异常,移植神经干细胞后,其受损的学习记忆功能得到明显改善^[4]。因此,有学者推测,神经退行性疾病与脑内神经发生不足有关^[5]。

Alzheimer 病(AD)是一种常见的老年痴呆症, β -淀粉样肽($A\beta$)作为 AD 的原发性损害或核心因素已得到公认^[6]。 $A\beta$ 的活性片段 $A\beta_{25-35}$ 具有很强的神经毒性。本研究拟观察 $A\beta_{25-35}$ 对痴呆小鼠模型海马神经发生的影响及中药“脑复聪”的干预作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及中药治疗 雄性 BALB/C 小鼠,体重 18—20g,由中国医学科学院动物研究所提供。随机分为对照、模型、给药组,均自由摄食饮水。中药方剂“脑复聪”由人参、丹参、何首乌、水蛭等 7 味中药组成,由

中国中医研究院中药研究所经水煮醇提成颗粒,配制成水溶液,生药含量 0.86g/ml。给药组按照 1.68g/kg 剂量连续灌胃 7 天,于第 8 天脑室内注射 $A\beta_{25-35}$ 造模后,再继续同剂量给药 7 天。模型组造模后不给药物。对照组给予等容积蒸馏水。

1.2 模型制作 用灭菌生理盐水配制 $A\beta_{25-35}$ (Sigma 产品)溶液,浓度 3 mmol/L,37℃孵育 72h 使其呈凝聚态。参照 Laursen 和 Belknap^[1]的方法,0.6%戊巴比妥钠麻醉,75%酒精消毒后在小鼠右侧脑室定位(A:-2 mm;L:2 mm;H:-4 mm),用 10 ml 微量注射器在其双耳前缘连接线中点偏右 1 mm 处垂直注入 $A\beta_{25-35}$ 3 ml,或等量生理盐水(对照组),针头原位保留 1 min 后缓慢拔针。术后连续肌注青霉素 4×10^4 u/天。

1.3 Morris 水迷宫测试 圆柱型水池(高 70 cm,直径 80 cm),内设一站台(直径 8 cm),上方通过数字摄像机与计算机相连。小鼠运动轨迹可被追踪并显示于屏幕上。水池中加水,高 25 cm,用炭素墨水染成不透明黑色,水温控制在 (22.0 ± 0.5) ℃,水面高出站台 0.5 cm,使小鼠看不到站台。实验采用每次入水点相同,每次训练 2 min 的方案,以小鼠找到站台的时间为寻台潜伏期,于造模后第 4 天上午和造模后第 5 天上午、下午各进行 1 次水迷宫测试,取平均值作为小鼠的学习成绩;于

作者单位:1.100730 北京市,北京协和医院中医科(张孟仁、郭赛珊);2.100005 北京市,中国协和医科大学基础医学院药理系(左萍萍、李学坤、孔令娜)。作者简介:张孟仁(1963-),男,山西大同市人,副主任医师,副教授,主要研究方向:脑血管病、糖尿病。

造模后第 7 天再进行 1 次测试,作为其记忆巩固成绩。

1.4 BrdU 注射及样本处理 分别在 Aβ₂₅₋₃₅ 注射后的第 4、7 天腹腔注射 BrdU 50 mg/kg,连续 3 次,间隔 8 h。于末次注射 24 h 后麻醉,剪开胸腔,暴露心脏,从左心尖处插入灌流针,剪开左心耳,先用 PBS 灌流,待血液冲洗干净后改用 4 %多聚甲醛,取脑,置于 4 %多聚甲醛中 4 ℃过夜,然后转入 30 %蔗糖中,4 ℃存放。用冰冻切片机切取 40 μm 脑片。

1.5 BrdU 免疫组化染色 将标本首先进行 DNA 变性,50 % formamide/2 × SSC 65 ℃处理 2 h。倾去液体后用 2 × SSC 洗 5 min,2 M HCl 37 ℃处理 30 min,0.3 % H₂O₂ 处理后,用含马血清,0.1 % TritonX-100 的 TBS 37 ℃封闭 30 min,加入鼠抗 BrdU 4 ℃过夜,TBS 洗 3 次,每次 10 min,加入 1:80 稀释的生物素化的马抗小鼠二抗,37 ℃下 2 h,TBS 洗 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化酶,室温 1 h,DAB 显色,室温凉干,乙醇、二甲苯透明后,中性树胶封片。显微镜下观察并照相。

1.6 阳性细胞计数 脑切片隔 5 取 1,每只动物取 4—6 张,在 40 倍物镜下计数双侧海马齿状回(包括门区和颗粒细胞下层)的 BrdU 阳性细胞,并用 CCD 相机照相。数据以每 mm² 阳性细胞数表示增殖细胞的数量。

1.7 受体结合活性检测 小鼠于末次行为测试后断头取脑,分离海马,加入 Tris-醋酸缓冲液 10 ml,4 ℃离心(15000rpm × 20 min),洗涤 3 次,将沉淀冻存于 -20 ℃,用时再离心 1 次,此即为脑突触粗膜。NMDA 受体检测采用 [³H]MK-801(NET-972,28.9 Ci/mmol),标记物终浓度为 6.57 nmol/L,非特异结合加入 10⁻⁴ mol/L MK-801,30 ℃反应 30 min,用 4 ℃缓冲液 20 ml 分 3 次洗涤,负压抽滤于纤维素膜上,滤膜置于闪烁杯中加入甲苯- TritonX-100 闪烁液 6 ml,用液闪仪测定 cpm 值。胆碱能 M 受体活性检测采用 [³H]QNB(NET-524,44 Ci/mmol),标记物终浓度为 7.58 nmol/L,非特异结合加入 10⁻⁴ mol/L Atropine,25 ℃反应 60 min。其余操作同上。

1.8 统计学处理 用统计软件进行单因素方差分析,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 Student' t 检验。

2 结果

水迷宫测试结果见表 1。脑内 NMDA 受体介导兴奋性氨基酸的毒性作用,是 Aβ₂₅₋₃₅ 产生神经毒的重要通路。胆碱能 M 受体激活可促进学习记忆过程。结果见表 2。镜下可见,对照组海马齿状回和 CA3 区均有散在分布的 BrdU 阳性细胞。脑室内注射 Aβ₂₅₋₃₅ 后,BrdU 阳性细胞很少,染色很浅;经中药治疗后,形态出现明显恢复,细胞染色变深,数量增多。结果见封三图 2 a—图 2 c 和表 3。

表 1 “脑复聪”颗粒对 Aβ₂₅₋₃₅ 致痴呆小鼠模型空间学习记忆(寻台潜伏期)的影响

分组	动物数	学习(s)	记忆(s)
对照组	18	84.0 ± 15.0	36.6 ± 10.6
模型组	20	97.4 ± 11.3	81.5 ± 14.6 ^a
给药组	20	69.75 ± 9.7	47.2 ± 12.9 ^b

注:a:与对照组相比,P<0.05;b:与模型组相比,P<0.05。

表 2 “脑复聪”颗粒对 Aβ₂₅₋₃₅ 致痴呆小鼠海马受体结合的影响(fmol/ mg prot)

分组	动物数	NMDA 受体	M Ach 受体
对照组	10	112.6 ± 7.5	2015 ± 193
模型组	10	198.0 ± 5.5 ^a	1309 ± 118 ^a
给药组	10	83.6 ± 6.0 ^b	1992 ± 46 ^b

注:a:与对照组相比,P<0.001;b:与模型组相比,P<0.001。

表 3 “脑复聪”颗粒对 Aβ₂₅₋₃₅ 致痴呆小鼠海马神经发生的影响(Cells/ mm²)

分组	样本数(n)	海马 BrdU 阳性细胞
对照组	17	2981 ± 281
模型组	8	2088 ± 190 ^a
给药组	9	2735 ± 341 ^b

注:a:与对照组相比,P<0.05;b:与模型组相比,P<0.05。

3 讨论

以前的研究认为,Aβ 的毒性作用包括,导致神经细胞内的 Ca²⁺ 失调、自由基产生增加、诱发炎症反应、影响凋亡基因表达等^[7],但对神经发生的影响尚未见报道。BrdU 可在细胞分裂周期的复制期(S 期)掺入到细胞核 DNA 内,因此 BrdU 阳性细胞主要是增殖细胞,代表细胞的增殖能力^[8]。本实验观察到,Aβ 使海马齿状回 BrdU 阳性细胞明显减少,这种作用至少维持 20 天以上。中药“脑复聪”含有人参、丹参、何首乌、石菖蒲等对中枢神经系统功能有明显保护作用或调节作用的成分。实验结果表明,该方剂能明显对抗 NMDA 受体介导的兴奋毒作用,并提高胆碱能受体活性,这与改善动物的空间认知能力密切相关。同时,本实验首次发现用该中药方剂治疗的小鼠,其海马齿状回 BrdU 阳性细胞明显增多,说明中药对神经的保护作用不仅在于减少神经损伤,还可促进新的细胞增殖。

[参考文献]

[1] Alvarez Buylla A, Garcia Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone [J]. J Neurosci, 2002, 22: 629—634.

[2] Kuhn HG, Dickinson Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation [J]. J Neurosci, 1996, 16: 2027—2033.

[3] Haughey NJ, Nath A, Chan SL. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease [J]. J Neurochem, 2002, 83: 1509—1524.

- [4] Qu T, Brannen CL, Kim HM, et al. Human neural stem cells improve cognitive function of aged brain[J]. Neuroreport, 2001, 12 (6) : 1127 — 1132 .
- [5] Armstrong RJE, Barker R. Neurodegeneration: a failure of neuroregeneration[J]. Lancet, 2001, 358 : 1174 — 1176 .
- [6] 盛树力.老年性痴呆:从分子生物学到老年痴呆[M].北京:科学技术文献出版社, 1998. 230 — 244 .
- [7] Cooper Kuhn CM, Kuhn HG. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain[J]. Dev Brain Res, 2002, 134 : 13 — 21 .
- [8] Yuan JY, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407 : 802 — 809 .

(收稿日期 : 2003-06-30)



图 1i 叠加
图 1g-图 1i 移植的神经干细胞在
PD 小鼠内存活



图 2a 对照组



图 2b 模型组



图 2c 给药组

图 2a-图 2c 海马颗粒下层神经干细胞的增殖 (BrdU)(scar=50 μ m)