

• 专题 •

β -淀粉样肽损伤后小鼠脑单胺氧化酶 B、白细胞介素-6 的变化及中药的干预作用

张孟仁 郭赛珊 左萍萍 杨楠

[摘要] 目的 观察 β -淀粉样肽($A\beta$)₂₅₋₃₅ 致痴呆小鼠模型脑单胺氧化酶 B(MAO-B)、白细胞介素-6(IL-6)的改变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;用比色法测 MAO-B 活性;免疫组化检测 IL-6。结果 模型小鼠的 Morris 水迷宫潜伏期(81.3 ± 13.4) s,比对照组(34.2 ± 10.9) s 延长($P < 0.05$);大脑皮层和海马的 MAO-B 活性(120.12 ± 10.15), (83.60 ± 5.29) 均较对照组(93.09 ± 10.54), (50.39 ± 9.16) 升高($P < 0.05 \sim 0.01$),海马齿状回有大量 IL-6 免疫荧光阳性细胞。经脑复聪治疗后,水迷宫潜伏期(43.7 ± 12.7) s 缩短($P < 0.05$);海马的 MAO-B 活性(47.11 ± 6.57) 回降($P < 0.01$);IL-6 免疫阳性神经细胞减少。结论 抑制海马 MAO-B 的过度激活,减少自由基的产生,减少氧化应激反应,抑制小胶质细胞产生炎症因子 IL-6,缓解 $A\beta$ 的损伤作用,阻断 AD 发病的重要环节,是中药脑复聪治疗 AD 的重要机理之一。

[关键词] β -淀粉样肽;痴呆;单胺氧化酶 B(MAO-B);白细胞介素-6(IL-6);脑复聪;小鼠

Effects of β amyloid peptide on the monoamine oxidase B, interleukin 6 in the brain of mice and the interfering effect of traditional Chinese medicine ZHANG Men-ren, GUO Sai-shan, ZUO Ping-ping, et al. Peking Union Medical College Hospital, Institute of Basic Medical Sciences, PUMC & ACMS, 100730 Beijing, China

[Abstract] **Objective** To observe the changes of monoamine oxidase-B (MAO-B), interleukin-6 (IL-6) in the cortex and hippocampus of Alzheimer's disease model mice and the effect of traditional Chinese medicine Naofucong. **Methods** Alzheimer's disease model was induced in mice by β -amyloid($A\beta$)₂₅₋₃₅ icv. Space learning and memorial ability was tested in Morris water maze. The activity of MAO-B was measured by colorimetric method. IL-6 was observed with the immunohistochemical stain. **Results** Mice in the model group presented longer latent periods of Morris water maze(81.3 ± 13.4) s, higher activities of MAO-B in brain cortex and hippocampus (120.12 ± 10.15 , 83.60 ± 5.29) compare with that of the control group, which was (34.2 ± 10.9) s, (93.09 ± 10.54) and (50.39 ± 9.16) ($P < 0.05 \sim 0.01$). There were many IL-6 positive cell in dentate gyrus of hippocampus of the model group. After administration with Naofucong grain, latent periods (43.7 ± 12.7) s and activities of MAO-B (47.11 ± 6.57) in hippocampus were recovered ($P < 0.05 \sim 0.01$), and the IL-6 positive cell in dentate gyrus decreased. **Conclusion** Naofucong grain can antagonize the $A\beta$ ₂₅₋₃₅ toxicity by decreasing the overactivation of MAO-B and the excretion of inflammatory medium by microglia, as well as improve the memory function.

[Key words] β -amyloid peptide; dementia; monoamine oxidase-B (MAO-B); interleukin-6 (IL-6); Naofucong; mice

中图分类号:R749.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)05-0327-02

[本文著录格式] 张孟仁,郭赛珊,左萍萍,等. β -淀粉样肽损伤后小鼠脑单胺氧化酶 B、白细胞介素-6 的变化及中药的干预作用[J].中国康复理论与实践,2005,11(5):327-328.

阿尔茨海默病(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^[1]。 $A\beta$ 的活性片段 $A\beta$ ₂₅₋₃₅ 具有很强的神经毒性,脑室内注射被广泛用作模拟 AD 的动物模型。本研究拟观察 $A\beta$ ₂₅₋₃₅ 致痴呆小鼠模型脑单胺氧化酶 B(MAO-B)、白细胞介素 6(IL-6)的变化及及中药脑复聪的干预作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及给药方法 昆明系雄性小鼠,体重 18~22 g,由中国军事医学科学院实验动物研究所提供。动物随机分为对照组、模型组、脑复聪治疗组,每组 10 只,自由摄食饮水。脑复聪治疗组予脑复聪 1.81 g/kg 连续灌胃 7 d,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 d。对照组、模型组给予等容积蒸馏水。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 0.86 g/ml。

1.2 主要试剂及仪器 $A\beta$ ₂₅₋₃₅:Sigma 公司;PEA:DuPont-NEN 公司;IL-6 抗体:中国医学科学院基础医学研究所提供;FITC 标记的羊抗鼠 IgG:北京中山生物技术有限公司;MAO-B 试剂盒:南京建成生物工程研究所。FJ2107-P 型液体闪烁计数器:西安 262 厂;显微镜及照相系统:Olympus;Avanti J-251 型低温超速离心机:Beckman 公司。

1.3 模型制作 用灭菌生理盐水配制 3 mmol/L $A\beta$ ₂₅₋₃₅ 溶液,37℃ 孵育 72 h 使其呈凝聚态。参照 Laursen 和 Belknap 的方法^[2],0.6%戊巴比妥钠麻醉,75%酒精消毒,用 10 μ l 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 μ l,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/d。

1.4 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。水池中加入 25 cm 深的水,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

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、杨楠)。作者简介:张孟仁(1963-),男,山西大同市人,副主任医师,主要研究方向:中药脑保护机制的研究、脑血管病、糖尿病。

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、下午各进行水迷宫测试,取平均值作为小鼠的学习成绩;于造模后第 7 天再进行 1 次测试,作为其记忆成绩。

1.5 MAO-B 测定 以苄胺为底物,在 MAO 作用下生成苄醛,以环己烷提取,在 242 nm 测定吸光度并计算出酶活性。

1.6 IL-6 测定 采用中国医学科学院基础医学研究所细胞生物室以大鼠胎肝提取液免疫小鼠得到的单克隆抗体。以此抗体从正常人骨髓 λ gt11 cDNA 文库中调出一个 1.2 Kb 的片段,经序列分析后于基因库中检索该序列,发现其与人 IL-6 cDNA 全长序列 100 % 同源。以此单克隆抗体作为一抗。二抗为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG。实验时将一抗 1 : 40 稀释,4 ℃ 孵育过夜;PBS 洗涤 3 次,加入二抗,4 ℃ 孵育 2 h;PBS 洗涤 3 次;甘油封片。以 494 nm 蓝光激发,显微镜下观察到 523 nm 绿或黄绿荧光即为阳性。

1.7 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's t 检验。

2 结果

在 3 次学习过程中,已看出模型组比对照组潜伏期延长,但由于个体差异较大,尚未达到显著性差异。在进行记忆能力测试,模型组与对照组出现显著性差异($P < 0.05$);而脑复聪治疗组比模型组成绩改善($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠 Morris 水迷宫潜伏期比较

组别	n	学习	记忆
对照组	10	78.8 ± 9.1	34.2 ± 10.9 ^a
模型组	10	66.4 ± 9.4	81.3 ± 13.4
治疗组	10	73.7 ± 9.6	43.7 ± 12.7 ^a

注:a:与模型组相比, $P < 0.05$ 。

模型组大脑皮层和海马的 MAO-B 活性均较对照组上升($P < 0.05 \sim 0.01$),脑复聪治疗后海马的 MAO-B 活性降低至正常水平($P < 0.01$),而大脑皮层的改善未达到统计学意义。见表 2。

表 2 各组小鼠脑 MAO-B 浓度比较($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$)

组别	n	大脑皮层	海马
对照组	10	93.09 ± 10.54 ^a	50.39 ± 9.16 ^b
模型组	10	120.12 ± 10.15	83.60 ± 5.29
治疗组	10	111.50 ± 7.04	47.11 ± 6.57 ^b

注:与模型组相比,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$ 。

显微镜下观察,对照组小鼠脑内基本没有荧光物质存在,模型组小鼠海马部位可见大量含有荧光物质的黄色细胞,排列密集,主要集中在海马的齿状回。脑复聪治疗后小鼠脑神经细胞内的荧光物质及其荧光强度较模型小鼠明显减少。见中插图 2.1 ~ 2.3。

3 讨论

1991 年 Kowell 等首次在大鼠大脑皮层和海马注

射 $\text{A}\beta_{1-40}$ 导致大鼠出现多种形式的学习记忆功能障碍^[3]。许多细胞培养实验证明, $\text{A}\beta$ 可以引起氧化应激反应,造成胆碱能神经元的损伤,并过度激活 NMDA 受体,使 Ca^{2+} 进入细胞内,引起神经细胞死亡。同时还可促进小胶质细胞发生炎症反应,分泌 IL-1、IL-6 和补体等介质,炎症和免疫因子可使 $\text{A}\beta$ 代谢异常加重,加速淀粉样蛋白沉积和神经纤维丝的形成,造成神经损伤。防止 $\text{A}\beta$ 沉积,减少其神经毒性作用是预防和治疗 AD 的重要环节。

MAO-B 可代谢组织中的各种生物活性胺类,主要是中枢神经系统中的儿茶酚胺和 5-羟色胺。在慢性神经退行性疾病中,中枢 MAO-B 活性是影响自由基形成的一个重要因素^[4]。已有文献报道,外周血小板 MAO-B 的活性增强与各种中枢神经疾患导致的痴呆症状有关^[5],且与 AD 的严重程度正相关^[6]。

本实验观察到, $\text{A}\beta$ 脑室注射可引起小鼠空间记忆能力减退,表明造模成功;且此变化与脑内 MAO-B 活性增强一致;同时病理学观察见海马齿状回有大量 IL-6 免疫荧光阳性细胞,表明 $\text{A}\beta$ 能引起氧化应激反应,激活了小鼠脑内小胶质细胞介导的炎症反应,使其分泌 IL-6 等介质,从而造成神经损伤,引起记忆功能减退。

现代药理研究证实,人参对中枢神经系统有双向调节作用,能抑制脑内 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATP}$ 酶,提高红细胞 SOD 含量及过氧化氢酶活性,抑制脂质过氧化,具有抗氧化作用,增强学习记忆能力^[7];何首乌有促进细胞代谢、对抗 SOD 活性的降低、增加 SOD 含量、抑制 MAO-B 抗氧化、抗衰老的作用^[8]。本实验结果显示,脑复聪具有对抗 $\text{A}\beta$ 致小鼠记忆能力的损伤,对海马 MAO-B 的过度激活有抑制作用。既往研究表明,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,还可促进新的细胞增殖^[9]。可用于 AD 治疗。

[参考文献]

[1]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.

[2]Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult sub-ventricular zone[J]. J Neurosci, 2002,22:629-634.

[3]Kowell NW, Yang LL, Cotman CW. β -amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage[J]. Brain Res, 1990,533:315-320.

[4]Fischer P, Gotz ME, Ellinger B, et al. Platelet monoamine oxidase B activity and vitamin B₁₂ in dementia[J]. Bio Psychiat, 1994,35:772-774.

[5]Danielczyk W, Streifler M, Konradi C, et al. Platelet MAO-B activity and the psychopathology of Parkinson's disease, senile dementia and multiinfarct dementia[J]. Acta Psychiatr Scand, 1998,78:730-736.

[6]Gotz ME, Fischer P, Gsell W, et al. Platelet monoamine oxidase B activity in dementia: a 4 year follow up[J]. Dementia, 1998,9:74-77.

[7]阴健,郭力弓.中药现代研究与临床应用(1)[M].北京:学苑出版社,1993.477-480.

[8]阴健.中药现代研究与临床应用(2)[M].北京:中医古籍出版社,1995.30-36.

[9]张孟仁,左萍萍,李学坤,等. 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[J].中国康复理论与实践,2003,9(7):390-392.

(收稿日期:2005-02-17)

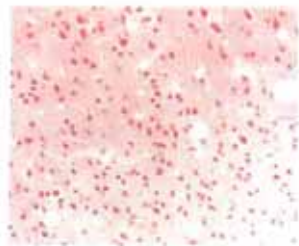


图 1.1 对照组脑叶淀粉样斑块
(刚果红, 20 ×)



图 1.2 模型组脑叶淀粉样斑块
(刚果红, 20 ×)



图 1.3 治疗组脑叶淀粉样斑块
(刚果红, 20 ×)

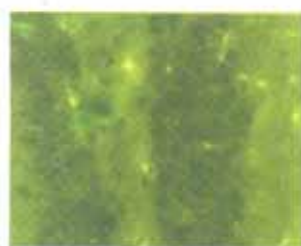


图 2.1 对照组海马齿状回 IL-6 表达

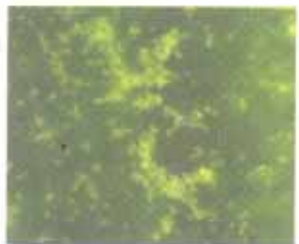


图 2.2 模型组海马齿状回 IL-6 表达

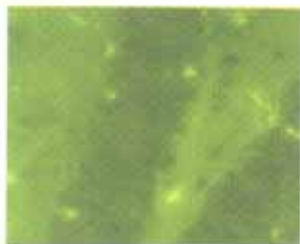


图 2.3 治疗组海马齿状回 IL-6 表达



图 3.1 对照组 24 h MMP-9 的表达
(400 ×)



图 3.2 对照组 5 d MMP-9 的表达
(400 ×)