

## - 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<sub>25-35</sub> 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<sub>25-35</sub> 造成痴呆模型小鼠。用 Morris 水迷宫测空间学习记忆功能;同位素配基测受体结合活性;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<sub>25-35</sub> 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]** -淀粉样肽;神经发生;海马;中药

**Effects of  $\beta$ -Amyloid peptide on neurogenesis in brain hippocampus of mice and interfering effect of traditional Chinese medicine**  
Zhang Mengren, Zuo Pingping, Li Xuekun, 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<sub>25-35</sub> icv. Space learning and memorial ability were tested with Morris Water Maze. The activity of NMDA and M receptor were measured with radioligand of [<sup>3</sup>H]MK-801 and [<sup>3</sup>H]QNB. Neurogenesis was observed with the BrdU immunohistochemistry. **Results** Space learning and memorial ability significantly decreased ( $P < 0.05$ ), [<sup>3</sup>H]MK-801 binding increased and [<sup>3</sup>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<sub>25-35</sub> 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]**  $\beta$ -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<sup>[1]</sup>。在衰老<sup>[2]</sup>或某些神经退行性病动物模型<sup>[3]</sup>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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。

Alzheimer 病(AD)是一种常见的老年痴呆症,-淀粉样肽(A<sub>β</sub>)作为 AD 的原发性损害或核心因素已得到公认<sup>[6]</sup>。A<sub>β</sub> 的活性片段 A<sub>25-35</sub> 具有很强的神经毒性。本研究拟观察 A<sub>25-35</sub> 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<sub>25-35</sub> 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<sub>25-35</sub> (Sigma 产品)溶液,浓度 3mmol/L,37℃ 孵育 72h 使其呈凝聚态。参照 Laursen 和 Belknap<sup>[1]</sup>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: -2mm;L: 2mm;H: -4mm),用 10ml 微量注射器在其双耳前缘连接线中点偏右 1mm 处垂直注入 A<sub>25-35</sub> 3ml,或等量生理盐水(对照组),针头原位保留 1min 后缓慢拔针。术后连续肌注青霉素 4 × 10<sup>4</sup> u/天。

**1.3 Morris 水迷宫测试** 圆柱型水池(高 70cm,直径 80cm),内设一站台(直径 8cm),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 25cm,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 0.5cm,使小鼠看不到站台。实验采用每次入水点相同,每次训练 2min 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 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 A<sub>25-35</sub> 注射后的第 4、7 天腹腔注射 BrdU 50mg/kg,连续 3 次,间隔 8h。于末次注射 24h 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 40μm 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 2h。倾去液体后用 2 ×SSC 洗 5min,2M HCl 37℃ 处理 30min,0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后,用含马血清,0.1% TritonX-100 的 TBS 37℃ 封闭 30min,加入鼠抗 BrdU 4℃ 过夜,TBS 洗 3 次,每次 10min,加入 1:80 稀释的生物素化的马抗小鼠二抗,37℃ 下 2h,TBS 洗 3 次,每次 5min,加入辣根过氧化酶,室温 1h,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 mm<sup>2</sup> 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 10ml,4℃ 离心(15000rpm ×20min),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 [<sup>3</sup>H]MK-801 (NET-972,28.9Ci/mmol),标记物终浓度为 6.57nmol/L,非特异结合加入 10<sup>-4</sup> mol/L MK-801,30℃ 反应 30min,用 4℃ 缓冲液 20ml 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 6ml,用液闪仪测定 cpm 值。胆碱能 M 受体活性检测采用 [<sup>3</sup>H]QNB (NET-524,44Ci/mmol),标记物终浓度为 7.58nmol/L,非特异结合加入 10<sup>-4</sup> mol/L Atropine,25℃ 反应 60min。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's *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 A<sub>25-35</sub> 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 A<sub>25-35</sub> 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。结果见图 2 a—图 2 c 和表 3。

**表 1 “脑复聪”颗粒对 A<sub>25-35</sub> 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 <sup>a</sup>
给药组	20	69.75 ± 9.7	47.2 ± 12.9 <sup>b</sup>

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 A<sub>25-35</sub> 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 <sup>a</sup>	1309 ± 118 <sup>a</sup>
给药组	10	83.6 ± 6.0 <sup>b</sup>	1992 ± 46 <sup>b</sup>

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 A<sub>25-35</sub> 致痴呆小鼠海马神经发生的影响(Cells/mm<sup>2</sup>)**

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 <sup>a</sup>
给药组	9	2735 ± 341 <sup>b</sup>

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,A<sub>25-35</sub> 的毒性作用包括,导致神经细胞内的 Ca<sup>2+</sup> 失调、自由基产生增加、诱发炎症反应、影响凋亡基因表达等<sup>[7]</sup>,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<sup>[8]</sup>。本实验观察到,A<sub>25-35</sub> 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]. *Nuroreport*, 2001, 12 (6): 1127—1132.
- [5] Armstrong RJ E, 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 J Y, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. *Nature*, 2000, 407: 802—809.

(收稿日期: 2003-06-30)

综述 ·

## 功能磁刺激在临床医学中的应用

孔瑛 张长杰\*

[关键词] 功能磁刺激; 脊髓损伤; 综述

中图分类号: R454.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2003)07-0392-02

自从 1945 年 Kolin 等从青蛙的肌肉神经标本中证实, 用磁片包裹坐骨神经会使其产生搏动, 并可在肌肉处记录出收缩<sup>[1]</sup>以来, 各国学者们就磁刺激 (magnetic stimulation, MS) 对神经肌肉和脑电活动进行了大量的研究。Barker 等对大脑皮层神经中枢进行了有效的刺激<sup>[2,3]</sup>, Amassian 等<sup>[4]</sup>、Cohen 等<sup>[5]</sup> 分别用实验证明, 不同方向放置的磁刺激线圈作用于大脑皮层引起不同手指活动。近几年来, 人们认识到 MS 作为一种兴奋神经系统和肌肉组织的无创治疗方法具有极大的临床应用价值。用于预防肌肉萎缩, 促进神经系统及身体各器官生理功能恢复的 MS 被称为功能磁刺激 (functional magnetic stimulation, FMS)。

### 1 磁刺激的基本原理

法拉第电磁场感应原理显示, 一个随时间变化的磁场可以感应出电场, 而与该空间的电导率无关。MS 是根据这一原理设计的。当磁场改变时, 能够产生一种感应电场, 而这种电场反过来阻碍磁场的变化, 其产生的涡旋电流能刺激神经或肌肉。因此, 从某种意义上讲, 磁刺激和电刺激的原理是一样的, 当感应电流值超过组织的兴奋阈值时, 组织就会兴奋, 达到象电刺激一样的效果。MS 应用范围广, 可以刺激肌肉、心肌等可兴奋组织, 还可用来刺激大脑、脊髓和外周神经, 以治疗各种神经原性疾病。

### 2 FMS 在临床上的应用

#### 2.1 对肺功能的影响

Harwinder 等在 12 名健康人的胸腰段进行 FMS 发现, 他们的最大呼气压力 (max-

imal expiratory pressure, MEP) 和补呼气量 (expiratory reserve volume, ERV) 分别有所增加, 证明在下胸腰段 (T<sub>8</sub> - L<sub>5</sub>) 使用 FMS 能很好地促进肺的呼吸功能和咳嗽功能的恢复, 尤以刺激 T<sub>9</sub> 水平效果最为明显<sup>[6]</sup>。Lin 等对脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 患者进行的类似实验也得出了相同结论, 他认为下胸段脊神经的 FMS 可以使 SCI 患者的呼吸功能得到显著改善, 在颈区使用 FMS 可使膈神经和上肋间神经受到刺激产生吸气功能, 胸腰区 FMS 导致下肋间肌和腹肌启动, 产生显著的呼气功能和咳嗽功能<sup>[7]</sup>。他们都认为 FMS 可以降低呼吸系统并发症的发生。

#### 2.2 对直肠和膀胱功能的影响

膀胱和直肠的排空问题一直是影响 SCI 和其他神经系统疾病患者生活质量的一个重要因素。国外学者经过研究发现, FMS 是一种无痛、易操作、有效的治疗方法。Lin 等将“8”字形的磁线圈放在大鼠的腹侧颈区, 通过磁刺激器进行刺激, 结果发现有明显促进结肠排空作用, 认为这是因为大鼠结肠由迷走神经支配, 通过 FMS 刺激迷走神经, 引起了结肠肌肉的更多生理活动<sup>[8]</sup>。Shafik 等将磁刺激器放在双侧骨盆神经节切除术后的狗骶神经根处进行间断性磁刺激, 结果发现膀胱内压、直肠内压均有增加, 且膀胱和直肠排空在磁刺激后 2—3min 内完成<sup>[9]</sup>。Lin 等对狗、正常人和 SCI 患者进行类似实验, 他发现将磁线圈放置在骶神经根处和耻骨上区都得到促进膀胱和直肠排空的结果, 且以骶神经根处的效果较为明显<sup>[10,11]</sup>。此外患者反映还有肠道功能增强, 人为排便需要减少及肠道蠕动频率增加等功效。Lin 等认为这是因为对骶神经根处进行磁刺激可引起骶神经兴奋, 从而使肌肉收缩引起排尿、排便。磁场具有不衰退, 能穿透骨、头皮、脂肪等高阻力组织的特性, 是一种很有发展潜力的促进膀胱和直肠排空的技术。

作者单位: 410011 湖南长沙市, 中南大学湘雅二医院康复科。作者简介: 孔瑛 (1978-), 女, 湖南长沙市人, 在读硕士, 主要研究方向: 骨关节损伤康复。\* 通讯作者: 张长杰 (1962-), 男, 湖南常德市人, 博士, 副教授, 主要研究方向: 骨关节损伤康复, 磁场生物学效应。



图 1a 对照(× 100)



图 1b 模型(× 100)

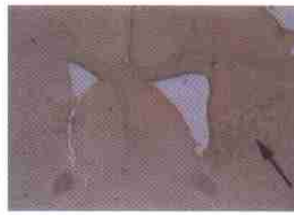


图 1c 单侧移植(× 15)



图 1d 单侧移植(× 100)

图 1a- 图 1b MPTP 对黑质酪氨酸羟化酶神经元的毒性作用

图 1c- 图 1f 移植的神经干细胞在 PD 小鼠内存活

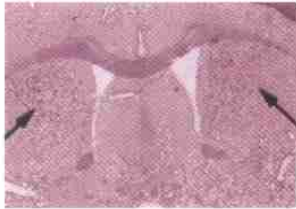


图 1e 双侧移植(× 15)



图 1f 双侧移植(× 100)



图 1g 抗 BrdU



图 1h 抗 TH

图 1c- 图 1f 移植的神经干细胞在 PD 小鼠内存活

图 1g- 图 1i 移植的神经干细胞在 PD 小鼠内存活



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=50μm)



图 3a 体外培养的神经干细胞(× 100)

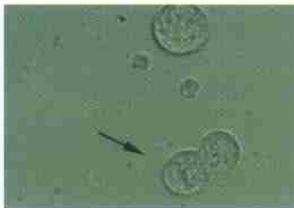


图 3b 神经干细胞的对称分裂(× 100)

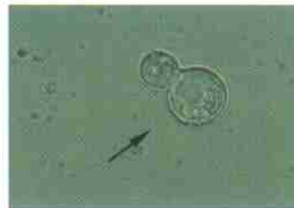


图 3c 神经干细胞的不对称分裂(× 100)

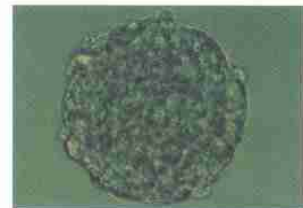


图 3d 神经干细胞增殖形成的神经球(× 100)

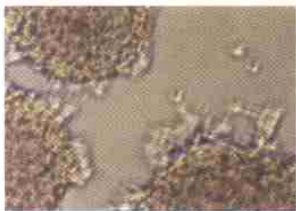


图 3e 相邻神经球之间建立的纤维联结(× 100)



图 3f- 图 3g 神经干细胞及其增殖形成的神经球均表达标志性抗原 nestin(× 100)

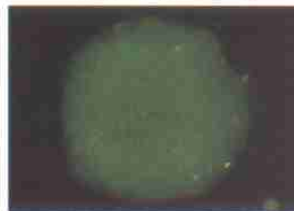


图 1a- 图 1i 见正文第 387-389 页

图 2a- 图 2c 见正文第 390-392 页

图 3a- 图 3k 见正文第 394-396 页

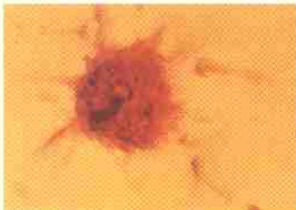


图 3h 神经干细胞增殖时可以掺入 BrdU(× 100)



图 3i 神经元(NSE<sup>+</sup>)



图 3j 星形胶质细胞(GFAP<sup>+</sup>)



图 3k 少突胶质细胞(Gal-C<sup>+</sup>)

图 3i- 图 3k 培养的神经干细胞能够分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞(× 100)