

牛珀至宝丹对老年记忆减退大鼠脑内 EGF 阳性神经元的影响*

★ 谢斌** 严小军 兰杨 张紫蓬 汪建民*** (江西中医学院 南昌 330006)

摘要:目的:研究牛珀至宝丹对老年记忆减退大鼠的脑尾壳核及皮质区 EGF 阳性神经元的影响。方法:以 Morris 水迷宫将老年大鼠(24 月龄)筛选为记忆正常组、记忆减退组和牛珀治疗组,免疫组化检测尾壳核及皮质区 EGF 阳性神经元数量的变化。结果:牛珀治疗组老年大鼠学习记忆能力明显提高,其脑内尾壳核及皮质区 EGF 阳性神经元数量明显增加,与记忆减退组比较,有显著性差异($P < 0.05$)。结论:老年记忆减退大鼠学习记忆能力显著提高可能与牛珀至宝丹增加脑尾壳核及皮质区 EGF 阳性神经元的数量有关。

关键词:牛珀至宝丹;老年记忆减退;EGF

中图分类号:R 285.5 文献标识码:A

Influence of NPZBD on EGF Positive neurons in aged hypomnesia rat's brain

XIE Bin, YAN Xiao-jun, LAN Yang, ZHANG Zi-peng, WANG Jian-min

Jiangxi University of traditional Chinese medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To study the influence of NPZBD on EGF positive neurons in Caudate putamen and cortex of aged hypomnesia rats. Methods: We randomly divided the aged rats into normal memory group, hypomnesia group and NPZBD treatment group with Morris water maze and detected changes of EGF Positive neurons in Caudate putamen and cortex with immunohistochemistry. Result: The ability of learning and memory in aged hypomnesia rats in NPZBD treatment group was improved than the rats in hypomnesia group; EGF positive neurons in Caudate putamen and cortex of aged hypomnesia rats in NPZBD treatment group was significant increased than the rats in hypomnesia group ($P < 0.05$). Conclusion: The ability of learning and memory in aged hypomnesia rats increased maybe connected with NPZBD increased EGF positive neurons in Caudate putamen and cortex of aged hypomnesia rats.

Key words: NPZBD; hypomnesia in aged; EGF

随着我国社会人口逐渐老龄化,神经系统退行性疾病如老年性痴呆、帕金森氏病等疾病的患病率和发病率也逐渐增高。在这类疾病中,脑结构和功能发生一系列退行性变化,其中最显著的特征是神经元丢失,神经元可塑性降低。虽然人类对神经系统退行性疾病进行了大量研究,但目前尚无特效疗法。通瘀开窍名方牛珀至宝丹对缺氧缺血性脑病的幼年大鼠脑细胞、线粒体、内质网有较好的保护作用,能减轻脑损伤神经元退行性变,抑制损伤区神经细胞过度凋亡^[1]。为探索该方治疗神经退行性病变的作用,本课题将牛珀至宝丹用于老年记忆减退

大鼠,观察其对老年记忆减退大鼠学习记忆能力及脑尾壳核和皮质区 EGF 阳性神经元数量的影响,以期对神经退行性疾病的治疗提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠(2 月龄)9 只,体重 250 ± 20 g,许可证号:JZDW NO:2008-0091;清洁级雄性 SD 大鼠(20 月龄)60 只,体重 450 ± 20 g,许可证号:JZDW NO:2008-0150。均由江西中医学院实验动物中心提供,饲养 4 个月。

1.1.2 药物 牛珀至宝丹(水牛角、羚羊角、琥珀、

* 资助项目:江西省教育厅科技项目(GJJ08323,赣教技字[2007]243 号)

** 作者简介:谢斌(1975-),男,讲师,博士,研究方向:中西医结合基础研究。E-mail: xiebin515331@sina.com。

*** 通讯作者:汪建民(1955-),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:神经解剖学。

大黄、当门子、蟾酥、玳瑁、血竭、藏红花、郁金、菖蒲、丹皮、连翘),经现代科学方法加工制成微丸制剂,由江西中医学院中药制剂室制作(批号:20080425)。

1.1.3 试剂 EGF 小鼠抗大鼠单克隆抗体, SANTA 公司产品(批号:L2607);即用型 SABC 试剂盒,博士德生物工程有限公司(批号:20080701)。

1.1.4 仪器 Morris 水迷宫及分析软件,北京药物研究所。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 Morris 水迷宫^[2]测得青年组大鼠平均逃避潜伏期(average escape latency)为(26.32±8.01)秒,以青年大鼠平均逃避潜伏期的均值加两倍标准差和加一倍标准差为参照标准,将平均逃避潜伏期大于前者的老年鼠归为记忆减退组(27只),将平均逃避潜伏期小于后者的老年鼠归为记忆正常组(16只),介于两者之间的老年鼠弃之(16只)。将大鼠随机抽样分为老年大鼠记忆正常组(9只)、记忆减退组(9只)、牛珀治疗组(9只)。记忆正常组及记忆减退组按生理盐水 1 ml/kg/d 灌胃;牛珀治疗组按 0.1 g/kg/d 灌胃;连续给药 15 d

后, Morris 水迷宫测试学习记忆能力。

1.2.2 EGF 免疫组化检测 实验结束,大鼠灌注固定,切取包含大鼠脑海马齿状回(dentate gyrus, DG)、侧脑室室管膜下区(subventricular zone, SVZ)脑组织块行冠状位连续冰冻切片,片厚 35 μm,每间隔 6 张切片取一片为一套,每套包括含 DG 和 SVZ 切片各 3 张。SABC 法免疫组织化学染色,按说明书操作。各切片分别用 OLYMPOUS 显微相机 10×40 倍照相,电脑屏幕上观察。每张切片选取脑内相同部位 5 个高倍视野进行拍照,其中包含 SVZ 切片选取尾壳核部位,包含 DG 切片选取皮质区,计数阳性细胞,取平均值作为结果。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS14.0 统计软件进行统计分析,定位航行实验采用重复测量多因素方差分析,空间探索实验及免疫组化结果采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 定位航行实验(place navigation)

牛珀至宝丹对老年记忆减退大鼠空间分辨学习记忆能力的影响,见表 1。

表 1 牛珀至宝丹对空间分辨学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	平均潜伏期				
	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5
记忆正常组	33.03±6.09	21.49±4.23	20.22±3.89	13.51±2.40	13.14±2.21
记忆减退组	46.47±7.86	33.72±5.47	27.58±5.02	23.72±3.10*	22.59±2.85*
牛珀治疗组	48.75±6.42	30.22±4.46	14.10±4.10 [#]	13.66±2.53 [#]	13.36±2.33 [#]

与记忆正常组比较,* $P<0.05$;与记忆减退组比较,[#] $P<0.05$ 。

由表 1 可知,第 4~5 d,牛珀治疗组大鼠平均潜伏期明显缩短,与记忆减退组比较,有显著性差异($P<0.05$),结果见表 1。

2.2 空间探索实验(spacial probe test)

牛珀至宝丹对老年记忆减退大鼠空间探索学习记忆能力的影响,见表 2。

表 2 牛珀至宝丹对空间探索学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	第Ⅱ象限停留时间 /s	第一次穿越时间 /s	穿越平台次数
记忆正常组	-	52.94±7.88	10.68±5.86	9.60±3.08
记忆减退组	-	32.36±2.10*	22.45±13.73*	2.83±0.86*
牛珀治疗组	0.1	49.16±7.68 [#]	11.95±5.46 [#]	7.64±1.29 [#]

与记忆正常组比较,* $P<0.05$;与记忆减退组比较,[#] $P<0.05$ 。

由表 2 可知,牛珀治疗组第Ⅱ象限停留时间、第一次平台穿越时间、穿越平台次数与记忆减退组比较,均有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 牛珀至宝丹对老年记忆减退大鼠脑内 EGF 阳性神经元的影响

见表 3。

表 3 牛珀至宝丹对脑内 EGF 阳性神经元的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	尾壳核 EGF 阳性神经元数量	皮质区 EGF 阳性神经元数量
记忆正常组	-	9.96±0.34	9.76±0.78
记忆减退组	-	8.43±0.90*	7.97±0.81*
牛珀治疗组	0.1	11.93±1.99* ^{###}	12.53±2.44* ^{###}

与记忆正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与记忆减退组比较,^{###} $P<0.01$ 。

由表 3 可知,牛珀治疗组大鼠大脑尾壳核和皮质区 EGF 阳性神经元明显增多,与记忆减退组比较,有极显著性差异($P<0.01$)。

3 讨论

老年性痴呆,又称阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD),是一种常见的中枢神经系统(central nervous system, CNS)退行性疾病,其主要症状为进行性认知障碍和记忆损害,在老年人群中的发病率

仅次于心脑血管疾病和癌症而位列第三,严重影响了老年人的健康和生活质量,目前尚无特效疗法。

神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs)是一类既能通过分裂增殖进行自我更新,产生大量子代 NPCs,又能迁移和分化成为多种类型神经元和神经胶质细胞的多潜能细胞^[3]。近年来在不同种类的成年动物以及成人脑内 SVZ 和 DG 等处发现有 NPCs 的存在^[4~5]。这些成年脑内的 NPCs 与胚胎期的 NPCs 一样具有增殖,迁移和分化为神经元和胶质细胞的多种潜能^[6~8]。有研究显示, NPCs 也可见于老年脑内,并可维持终身^[9~11]。由于发现在老年脑中有 NPCs 存在,并且这些 NPCs 具有产生新神经元的能力,因此利用 NPCs 补偿丢失的神经元已成为防治神经退行性疾病的新的策略^[12]。

1962 年, Dr. Stanley Cohen 发现 EGF, 由 53 个氨基酸构成,最大特点是能够促进细胞的增殖分化,从而以新生的细胞代替衰老和死亡的细胞。孙晋浩等^[13]从孕 11d 大鼠胚胎神经管取材 NPCs,在培养基内加入 EGF 后, NPCs 生长旺盛,细胞突起长,生长快,并连成致密的网状。外源性 EGF 可促进正常成年鼠脑室管膜下区内 NPCs 的增殖^[14],改善认知行为能力,表明 EGF 可作为活体成年脑室管膜下区内 NPCs 的调控因素之一。余剑等^[15]也观察到,脑皮质梗死后 24~48 h 脑室内注入外源性 EGF,梗死灶同侧脑室管膜下区(SVZ)内 NPCs 显著增多,并沿胼胝体向梗死灶方向或向基底节区方向迁徙,这种作用直到脑卒中后 3 周才减弱,表明短时应用 EGF 就能较长期促使侧脑室管膜下区内 NPCs 的增殖。且 EGF 能在 NSCs 增殖的后期发挥作用^[16]。另有研究表明,成年鼠 EGF 受体的表达仅限于室下区和齿状回。敲除 ErhB 基因,缺乏 EGFR 功能的鼠皮质神经发生区消失,提示 EGF 在前体细胞增殖和分化中起作用,也可能对细胞生存和迁移起作用。

牛珀至宝丹为清代何廉臣《重订广温热论》犀珀至宝丹原方基础上,以水牛角代犀角,并去金箔、猪心血、穿山甲、朱砂、加大黄,经现代科学方法加工制成的微丸剂型,具有通瘀开窍,芳香化浊之功。章氏将它运用于缺氧缺血性脑病的研究^[1],证实其对脑细胞、线粒体、内质网有较好的保护作用,能减轻脑损伤神经元退行性变,抑制损伤区神经细胞过度凋亡。为探索通瘀开窍方剂牛珀至宝丹对神经退行性病变的疗效,本课题将牛珀至宝丹用于老年记忆减退大鼠,观察其对学习记忆能力及脑内 EGF 阳性神经元的影响。

研究结果显示, Morris 水迷宫定位航行实验第 4

~5d,牛珀治疗组大鼠平均潜伏期明显缩短,与记忆减退组比较,有显著性差异($P < 0.05$);空间探索实验,牛珀治疗组大鼠第 II 象限停留时间、第一次平台穿越时间、穿越平台次数与记忆减退组比较,有显著性差异($P < 0.05$);牛珀治疗组大鼠脑内尾壳核和皮质区的 EGF 阳性神经元明显增多,与记忆减退组比较,有极显著性差异($P < 0.01$)。该结果证实,牛珀至宝丹对老年记忆减退大鼠学习记忆能力有明显促进作用,能显著增加大鼠脑内尾壳核及皮质区 EGF 阳性神经元的数量,有可能在一定程度上影响内源性 NPCs 的增殖,达到治疗 CNS 退行性疾病的效果。

参考文献

- [1] 章韵. 牛珀至宝丹对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤保护作用的研究[M]. 暨南大学博士学位论文, 2005.
- [2] 胡镜清, 温泽淮, 赖世隆. Morris 水迷宫检测的记忆属性与方法学初探[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 117-119.
- [3] Gage FH. Neurogenesis in the Adult Brain[J]. J Neurosci, 2002, 22: 612-613.
- [4] Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, et al. Neurogenesis in the Neocortex of Adult Primates[J]. Science, 1999, 286: 548-552.
- [5] Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, et al. The Adult Substantia Nigra Contains Progenitor Cells with Neurogenic Potential[J]. J Neurosci, 2002, 22: 6639-6649.
- [6] Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson J, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. Nat Med, 1998, 4: 1313-1317.
- [7] Gould E, Reeves AJ, Fallah M. Hippocampal neurogenesis in adult Old world primates[J]. Proc. Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 263-267.
- [8] Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain[J]. Science, 1994, 264: 1145-1148.
- [9] Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells[J]. Nat Rev Neurosci. 2006, 7: 395-406.
- [10] Bernal GM, Peterson DA. Neural stem cells as therapeutic agents for age-related brain repair[J]. Aging Cell, 2004, 3: 345-351.
- [11] Goldman SA, Kirschembaum B, Harrison-Restelli C, et al. Neuronal precursor cells of the adult rat ventricular zone persist into senescence, with no change in spatial extent or BDNF response[J]. J Neurobiol, 1997, 32: 554-566.
- [12] Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus[J]. J Neurosci, 1998, 18: 206-212.
- [13] 孙晋浩, 杨琳, 高英茂. 表皮细胞生长因子促进胚胎神经干细胞生长分化的研究[J]. 山东大学学报: 医学版, 2004, 42(1): 26-28.
- [14] Fiore M, Triaca V, Amendola T, et al. Brain NGF and EGF administration improves passive avoidance response and stimulates brain precursor cells in aged male mice[J]. Physiol Behav. 2002, 77(2-3): 437-443.
- [15] 余剑, 曾进胜, 盛文利, 等. 表皮细胞生长因子对脑梗死大鼠脑室管膜下区神经干细胞迁徙和分化的影响[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(23): 1966-1967.
- [16] Ciccolini F. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development[J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(5): 895-907.

(收稿日期: 2009-07-13)