

# 重复经颅磁刺激对侧脑室内注射 A $\beta$ 淀粉样蛋白的阿尔茨海默病大鼠学习记忆功能的影响

赵文娟<sup>1</sup> 张 玥<sup>2</sup> 邹春颖<sup>3</sup>

## 摘要

**目的:**旨在探讨重复经颅磁刺激(rTMS)对侧脑室内注射 A $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ 25-35)的阿尔茨海默病(AD)大鼠学习记忆障碍的影响。

**方法:**选用健康雄性 SD 大鼠,采用电跳台法进行筛选,分为模型组、磁刺激组、假手术组和正常组,每组 10 只。A $\beta$ 25-35 侧脑室内注射制备 AD 大鼠模型。磁刺激组大鼠给予 rTMS,刺激强度 0.5T,频率为 1Hz,每次连续刺激 30 个脉冲,刺激间隔 2s;每天 2 次,间隔 8h,连续 2 周。假手术组线圈垂直于颅骨表面,仅听见刺激声音实际未给予刺激;模型组和正常组不给予 rTMS。rTMS 结束后,所有大鼠均进行 Morris 水迷宫实验。

**结果:**采用侧脑室内注射淀粉样蛋白 A $\beta$ 25-35 成功地制备 AD 大鼠模型。通过 Morris 水迷宫检测各组大鼠的记忆功能:①定向航行实验;磁刺激组大鼠的逃避潜伏期比模型组明显缩短( $P<0.01$ ),但仍长于正常组和假手术组的平均逃避潜伏期( $P<0.01$ );假手术组和正常组间比较无显著性差异( $P>0.05$ );②空间探索实验;各组大鼠的平台象限游泳时间比较有显著性差异( $F=5.864, P<0.05$ ),磁刺激组大鼠的平台象限游泳时间比模型组的平台象限游泳时间所占百分比明显提高( $P<0.05$ )。

**结论:**rTMS 能够部分修复侧脑室内注射 A $\beta$ 25-35 的 AD 大鼠的记忆障碍,是一种潜在的 AD 治疗方法。

**关键词:** 阿尔茨海默病;重复经颅磁刺激;A $\beta$  淀粉样蛋白;学习记忆功能

中图分类号:R749.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-01-0045-05

**A study on repetitive transcranial magnetic stimulation improving dysfunction of learning and memory of Alzheimer's disease rats by injecting  $\beta$ -amyloid protein into lateral cerebral ventricle/ZHAO Wenjuan, ZHANG Yue, ZOU Chunying//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(1): 45-49**

## Abstract

**Objective:** To investigate the effect of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on dysfunction of learning and memory of Alzheimer's disease (AD) rat model by injecting  $\beta$ -amyloid protein(A $\beta$ 25-35) into lateral cerebral ventricle.

**Method:** Forty healthy male SD rats were randomly divided into four groups. The AD rat model was established by injecting A $\beta$ 25-35 into lateral cerebral ventricle of rats. The sham operation group was given injecting normal saline at the same site. From the AD rat models, 10 rats were chosen as rTMS group. The rTMS group was given rTMS, 30 pulses for each session, with intensity of 0.5T and frequency of 1Hz, twice a day with 8h intersession, for 2 weeks. And then, Morris water maze tests were investigated to detect memory function in four groups.

**Result:** The AD rat model was successfully made by injecting A $\beta$ 25-35 into lateral cerebral ventricle. The results of Morris water maze behavioral tests: ①In place navigation test, the average escape latency in rTMS group was shorter than that in AD group significantly( $P<0.01$ ) and longer than that in normal group and sham operation group ( $P<0.01$ ), but there was no significant difference between normal group and sham operation group ( $P>0.05$ ); ②In

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.01.010

1 天津市环湖医院神经内科,天津,300060; 2 天津市环湖医院康复科; 3 佳木斯大学附属第一医院神经内科

作者简介:赵文娟,女,博士,主治医师; 收稿日期:2010-02-19

spatial probe test, the swim time in platform quadrant in rTMS group was longer than that in AD group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The rTMS intervention can improve learning or memory function of AD rat model by injecting A $\beta$ 25-35 into lateral cerebral ventricle. The outcome suggested that rTMS may be a potential rehabilitative treatment for AD.

**Author's address** Department of Neurology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin, 300060

**Key word** Alzheimer's disease; repetitive transcranial magnetic stimulation;  $\beta$ -amyloid protein; learning and memory function

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以记忆力减退、认知功能障碍、行为异常为特征的脑退行性疾病,是痴呆的最常见类型之一。近年来,研究发现 AD 患者大脑中老年斑的主要成分:A $\beta$  淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ ),可能是该病发病机制中的起始因素和关键环节<sup>[1-2]</sup>。重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)通过放置于头部的线圈产生电流,于特定脑区生成一定的磁场,不仅影响刺激局部和功能相关的远隔皮质功能,实现皮质功能的区域性重组,而且产生的生物学效应可以持续到刺激停止后的一段时间, rTMS 已成为研究神经网络功能重建的良好工具<sup>[3]</sup>。目前, rTMS 已成功用于抑郁症、精神分裂症、强迫症、癫痫、帕金森病等的治疗<sup>[4-6]</sup>。随着社会老龄化加快,痴呆以及认知功能障碍成为 21 世纪的研究热点之一,国内外关于 rTMS 的研究主要集中在神经精神系统疾病的机制研究和治疗效果方面,例如对痴呆患者学习记忆能力减退治疗作用的研究<sup>[7-8]</sup>。本文采用大鼠侧脑室内注射 A $\beta$ 25-35 的造模方法制备 AD 大鼠模型,并对部分 AD 大鼠施加 rTMS 干预,旨在探讨 rTMS 对 AD 大鼠模型的学习记忆障碍的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物:** 3 月龄健康雄性 SD 大鼠,体重 275—350g,标准环境下饲养,室温(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,相对湿度(60 $\pm$ 5)%,明/暗 12h 周期交替(7:00—19:00 明/19:00—7:00 暗),自由饮食。

**1.1.2 试剂与仪器:** 淀粉样蛋白片断 25—35 (A $\beta$ 25-35),购自美国 Sigma 公司;SN-3 型脑立体定位仪,日本 Narishige 公司;经颅磁刺激仪,美国 Cadwell 公司 MES-10;Morris 水迷宫测试系统,北京新天地科技有限公司 RB-100A。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组:** 本文所有实验用鼠均采用电跳台法进行实验筛选,将大鼠放入箱内熟悉环境 5min 后开始测试。首先给予铃声刺激,刺激 5s 后通电 10s,电压为 40V,休息 20s 后再循环,每次共 10 个循环。选反应良好大鼠(通电后 5s 内找到跳台者)进入实验,平均分为模型组、磁刺激组、假手术组和正常组,每组 10 只。其中,假手术组的设置是为了观察手术因素对学习记忆是否有影响。术后采用电跳台法,计算错误次数和受电击时间验证模型制备是否成功,错误次数指不能主动回避电击的次数,受电击时间指每次测试每只大鼠的触电时间之和。

**1.2.2 A $\beta$ 25-35 溶液的配制:** 实验前将 A $\beta$ 25-35 溶于无菌生理盐水,浓度为 1g/L,后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱内孵育 1 周,使其变为聚集状态的 A $\beta$ 25-35,放置在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内备用。

**1.2.3 A $\beta$ 25-35 侧脑室内注射:** 对模型组和磁刺激组分别进行 A $\beta$ 25-35 侧脑室内注射。腹腔注射 10% 水合氯醛(剂量为 0.3g/kg)麻醉大鼠后,固定于脑立体定位仪上,剪去头顶部毛发,碘酊消毒后切开颅骨皮肤及皮下组织,充分暴露颅骨。参照包新民的《大鼠脑立体定位图》,确认侧脑室位置为前囟后 1.0mm、中线旁开 1.7mm 处,硬脑膜下 4.0mm。用三棱针在左右侧脑室处各钻一孔,用微量注射器每侧分别缓慢注入 5 $\mu$ g 的 A $\beta$ 25-35 溶液,10min 内注射完毕,留针 5min 后缓慢撤针。严格消毒后缝合切口。假手术组注入等体积的无菌生理盐水。

**1.2.4 经颅磁刺激:** 磁刺激组在手术恢复 5d 后开始进行重复经颅磁刺激。磁刺激组大鼠给予重复经颅磁刺激时,将线圈平行置于大鼠的颅骨顶点上方,紧贴皮肤但不接触头皮;为观察磁刺激声音对学习记忆是否有影响,假手术组给与假刺激,假手术组线圈垂直于颅骨表面,仅听见刺激声音实际未给予刺激;

模型组和正常组不给予重复经颅磁刺激。参考 Luft 等人的研究<sup>[9]</sup>,重复经颅磁刺激选用“8”字形线圈,线圈大小为 5cm×9cm,刺激的频率为 1Hz,刺激强度为 0.5 Tesla,每次连续刺激 30 个脉冲,刺激间隔 2s;每天 2 次,间隔 8h,连续 2 周。

**1.2.5 Morris 水迷宫实验:**rTMS 结束后,所有大鼠均进行 Morris 水迷宫行为学实验,实验包括定向航行实验和空间探索实验。Morris 水迷宫是直径为 150cm、高度 50cm 的圆形水池,水面高度 30cm,水温(25±1)℃。圆形平台固定放置于某一象限中心,低于水平面 2cm,水中放入适量墨水使平台不可见。①定向航行实验:分别从 3 个象限(除平台所在象限)将大鼠逐一面向池壁放入水中,鼠头均朝向同侧,记录大鼠在水中寻找并爬上平台的时间,即逃避潜伏期。设定大鼠在平台上停留 2s 为找到平台。如果大鼠在 120s 内未找到平台,则拖拽其尾部引至平台,停留 30s 以熟悉环境,此时逃避潜伏期记为 120s。实验连续 4d,每天分上午和下午两个时间段,每个时间段训练大鼠 3 次。②空间探索实验:第 5 天撤去平台,于第 I 象限入水点处将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠在 120s 内的运动轨迹。计算其在平台象限游泳时间占总游泳时间的百分比。每次实验结束,立即擦干并吹干大鼠毛发放回笼中,常规饲养。

### 1.3 统计学分析

数据采用 SPSS15.0 统计软件进行分析。使用有重复因素的两因素方差分析 (Two-way ANOVA)和独立样本 *t* 检验对 Morris 水迷宫实验数据进行相应的统计学分析, $P<0.05$  表示差异具有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 模型制备

模型鼠和对照鼠出现错误次数分别为 8.3±2.5 和 6.9±3.1 ( $P<0.05$ ),受电击时间为(73.6±25.1)s 和 (35.8±23.7)s ( $P<0.01$ )。

### 2.2 定向航行实验

采用两因素方差分析模型组、磁刺激组、假手术组和正常组水迷宫定向航行实验结果的数据,结果显示各组之间平均逃避潜伏期比较差异有显著性意义( $F=6.932, P<0.05$ )。其中模型组大鼠的平均逃避潜伏期比正常组和假手术组大鼠明显延长 ( $F=$

61.043,  $P<0.001$ );实施 rTMS 后,磁刺激组大鼠的逃避潜伏期比模型组的明显缩短( $F=22.598, P<0.01$ ),但仍长于正常组和假手术组大鼠的平均逃避潜伏期( $F=14.625, P<0.01$ );假手术组和正常组组间比较无显著性差异( $F=0.04, P>0.05$ )(见表 1、图 1)。

### 2.3 空间探索实验

各组大鼠在 120s 内搜索平台的运动轨迹通过边缘式、随机式、趋向式和直线式 4 种策略来显示。本实验中,模型组大鼠约 80%以上采用边缘式和随机式搜索平台,假手术组和正常组除训练第 1 天上午多采用边缘式和随机式外,以后训练时段均采用直线式和趋向式寻找平台,磁刺激组随机式和趋向式较多。

各组大鼠的平台象限游泳时间百分比经比较有显著性差异( $F=5.854, P<0.05$ )。模型组大鼠的平台象限游泳时间比正常组和假手术组大鼠的平台象限游泳时间所占百分比明显降低( $P<0.01$ );实施 rTMS 后,磁刺激组大鼠的平台象限游泳时间比模型组大鼠的平台象限游泳时间所占百分比明显增高( $P<0.01$ ),但仍低于正常组大鼠的平台象限游泳时间百分比( $P<0.01$ );假手术组大鼠与正常组大鼠的平台象限游泳时间百分比无显著性差异( $P>0.05$ ),见表 2。

表 1 4 组大鼠定向航行实验平均逃避潜伏期比较( $\bar{x}\pm s, s$ )

训练天数	模型组	磁刺激组	假手术组	正常组
第 1 天	62.38±9.12	56.85±9.88	52.24±10.93	54.30±10.11
第 2 天	43.52±8.74	34.14±6.57	29.12±6.75	26.89±9.36
第 3 天	34.26±7.97	26.73±5.45	19.09±5.42	21.87±5.21
第 4 天	27.63±6.95	19.59±5.09	12.60±3.31	11.38±3.82

表 2 空间探索实验各组大鼠平台象限游泳时间百分比的比较 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

	模型组	磁刺激组	假手术组	正常组
平台象限游泳时间百分比	37.91±7.84 <sup>①</sup>	50.87±10.73 <sup>②③</sup>	76.09±11.42 <sup>④</sup>	79.21±9.33

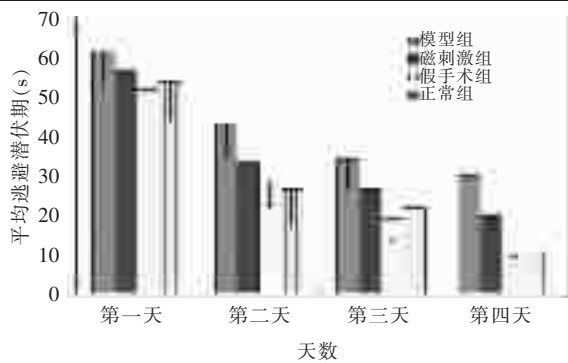
①与正常组和假手术组比较  $P<0.01$ ;②与模型组比较  $P<0.01$ ;③与正常组和假手术组比较  $P<0.01$ ;④与正常组比较  $P>0.05$

## 3 讨论

A $\beta$  淀粉样蛋白沉积引起的老年斑是 AD 的主要病理特征之一,也是 AD 神经病理改变的一个始



图1 4组大鼠定向航行实验结果



发因素, Aβ可直接引起 Tau 蛋白的过度磷酸化和神经原纤维缠结的形成, 最终导致神经退行性改变。已有的研究表明, Aβ<sub>25-35</sub> 是 Aβ 的主要毒性片段, Aβ<sub>25-35</sub> 可导致细胞色素 C 释放、线粒体膨胀、线粒体耗氧量显著增加, 促进自由基的形成, 自由基大量产生, 激活炎性因子, 引起脑组织局部炎症等一系列反应, 导致突触减少、神经元缺损、神经网络破坏, 继而出现中枢整合功能异常<sup>[10]</sup>。另外, Aβ<sub>25-35</sub> 在大脑中的过量生成、聚集、沉积可引起神经元钙稳态失衡, 即通过增大钙通道电流引起钙超载, 与神经细胞凋亡相关<sup>[11]</sup>。体外凝聚态 Aβ 与 AD 患者脑中的 Aβ 有相似的结构。目前, AD 模型的制备多采用将凝聚态 Aβ 注射在脑内的侧脑室、Meynert 基底核和海马等处。由于侧脑室注射 Aβ 产生的作用广泛, 近年多为国外学者所采用<sup>[12]</sup>。本研究通过侧脑室内注射 Aβ<sub>25-35</sub> 成功制备 AD 大鼠, 模型鼠和对照鼠出现错误次数分别为 8.3±2.5 和 6.9±3.1 (P<0.05), 受电击时间为 (73.6±25.1) s 和 (35.8±23.7) s (P<0.01)。

rTMS 通过放置于头部的线圈产生电流, 于特定脑区生成一定的磁场, 影响脑部生理功能。其作用范围不仅位于刺激线圈下方的局部区域, 而且还可通过跨突触联系, 作用于远端位点。Cristina 等首次证实了 rTMS 能够短暂地改善有记忆减退表现的老龄人群的联想记忆能力, 根据功能 MRI 的血氧水平信号的高低, 揭示了 rTMS 引起了右侧前额叶的募集反应<sup>[13]</sup>。功能 MRI 或 PET 的研究也表明了记忆力减退的老年人存在这种右侧或双侧的代偿反应。这反映了 rTMS 具有补充代偿性神经网络的潜能, 这种代偿性神经网络参与了记忆编码的过程。说明 rTMS 能够短期改善有记忆减退现象的老年人的脑功能和

认知功能<sup>[14-15]</sup>。由于高频磁刺激有易化局部神经元活动的作用, 从而有增加大脑皮质兴奋性, 诱发癫痫的可能, 故本研究中采用低频磁刺激, 刺激频率为 1Hz。根据 Luft 等人报道的 rTMS 刺激大鼠运动阈值<sup>[9]</sup>, 采用 0.5T 刺激强度。另有研究表明至少隔日 1 次的 rTMS 所产生的生物学效应方可形成叠加, 且持续超过 10d 时间的 rTMS 治疗的效果优于仅持续 10d 时间的治疗<sup>[16]</sup>, 故本研究采用每次连续刺激 30 个脉冲, 刺激间隔 2s; 每天 2 次间隔 8h, 连续 2 周, 以探讨其对学习记忆所产生的影响。

本研究采用电跳台法进行筛选分组及评价模型, 以避免同一种检测方法所产生的短、长期记忆的可能性。为减少同一种检测方法的多次使用造成的结果偏差, 本研究在经颅磁刺激之后对所有大鼠均进行了 Morris 水迷宫学习记忆行为测试, 其中定向航行实验中逃避潜伏期的长短反映动物空间记忆的获得情况, 经过 4d 的定向航行试验的训练, 使得大鼠对平台位置及空间环境形成一定的长期记忆。空间探索实验主要考察动物参考记忆的再现能力, 在第 5 天的空间探索试验中撤去平台, 观察大鼠对平台位置的记忆能力。结果表明定向航行实验中, 同期组间比较说明 AD 模型组平均逃避潜伏期比正常组和假手术组明显延长, 而正常组和假手术组之间比较无显著性差异, 表明手术因素及刺激声音对大鼠学习及记忆无明显影响; 空间探索实验中模型组大鼠的平台象限游泳时间所占百分比明显降低 (P<0.01), 由此可见, 未进行重复经颅磁刺激的 AD 大鼠对平台位置的学习、记忆能力明显减低, 进一步说明了 AD 大鼠模型的成功制备。实施 rTMS 后, 磁刺激组大鼠的平台象限游泳时间比模型组大鼠的平台象限游泳时间所占百分比明显增高 (P<0.01), 组间比较和同期组间比较显示 rTMS 组平均逃避潜伏期比 AD 组明显缩短, 平台象限游泳时间比模型组大鼠的平台象限游泳时间所占百分比明显增高 (P<0.01), 表明经过 rTMS 后, AD 大鼠对平台位置的学习记忆能力有了明显提高, 说明 rTMS 干预可以明显改善 AD 大鼠的学习记忆能力。本研究还比较了进行重复经颅磁刺激的 AD 大鼠与正常大鼠的学习记忆能力, 发现进行了重复经颅磁刺激的 AD 大鼠的学习记忆能力仍明显低于正常组大鼠。可能是由

于 rTMS 停止后的后续效应持续时间长短还不明确,有待开发更精确的脑区定位导航工具使线圈置于头部的位置更加准确,使刺激更为有效。

#### 4 结论

本研究结果显示,rTMS 干预能够改善 AD 大鼠的学习记忆能力,说明 rTMS 对记忆障碍有修复作用。临床上应该关注 rTMS 对认知功能的潜在影响,使之发展成为安全、有效的 AD 研究工具或治疗手段之一。

#### 参考文献

- [1] Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update[J]. *J Neural Transm*, 2002, 109(5-6):813—836.
- [2] Verdile G, Fuller S, Atwood CS, et al. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? [J]. *Pharmacol Res*, 2004, 50 (4): 397—409.
- [3] Cotelli M, Manenti R, Cappa SF, et al. Effect of transcranial magnetic stimulation on action naming in patients with Alzheimer disease[J]. *Arch Neurol*, 2006, 63(11): 1602—1604.
- [4] Filipovic SR, Rothwell JC, van de Warrenburg BP, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2009, 24(2): 246—253.
- [5] Lam RW, Chan P, Wilkins-Ho M, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant depression: a systematic review and meta analysis [J]. *Can J Psychiatry*, 2008, 53 (9): 621—631.
- [6] 宋为群, 李永忠, 杜博琪, 等. 低频重复经颅磁刺激治疗视觉空间忽略的临床研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(6): 483—486.
- [7] Cotelli M, Manenti R, Cappa SF, et al. Transcranial magnetic stimulation improves naming in Alzheimer disease patients at different stages of cognitive decline [J]. *Eur J Neurol*, 2008, 15 (12): 1286—1292.
- [8] 韩肖华, 黄晓琳, 王熠钊, 等. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠学习记忆功能的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(6): 494—497.
- [9] Luft AR, Kaelin-Lang A, Hauser TK, et al. Transcranial magnetic stimulation in the rat [J]. *Exp Brain Res*, 2001, 140(1): 112—121.
- [10] Clementi ME, Marini S, Coletta M, et al. A $\beta$ (31-35) and A $\beta$ (25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: role of the redox state of methionine-35[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(13): 2913—2918.
- [11] 刘江红, 许贤豪, 黎健, 等. 淀粉样蛋白 25-35 致神经细胞损伤的机制及信号转导通路初步研究 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2006, 13(3): 129—132.
- [12] Cakala M, Malik AR, Strosznajder JB. Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid beta peptide-evoked memory impairment in mice[J]. *Pharmacol Rep*, 2007, 59(2): 164—172.
- [13] Sole-Padullés C, Bartrés-Faz D, Junqué C, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation effects on brain function and cognition among elders with memory dysfunction. A randomized sham-control study [J]. *Cereb Cortex*, 2006, 16 (10): 1487—1493.
- [14] Reuter-Lorenz PA, Jonides J, Smith EE, et al. Age differences in the frontal lateralization of verbal and spatial working memory revealed by PET[J]. *J Cogn Neurosci*, 2000, 12(1): 174—187.
- [15] Rosen AC, Prull MW, O'Hara R, et al. Variable effects of aging on frontal lobe contribution to memory[J]. *Neuro Report*, 2002, 13(18): 2425—2428.
- [16] Bäumer T, Lange R, Liepert J, et al. Repeated premotor rTMS leads to cumulative plastic changes of motor cortex excitability in humans[J]. *Neuroimage*, 2003, 20(1): 550—560.