

补阳还五汤与六味地黄丸合方对脑缺血大鼠 APP 蛋白
及突触重构的影响

邢兆宏¹,张秋霞^{2*},赵晖²,张琪²,王海征²

(1. 首都医科大学附属朝阳医院,北京 100020; 2. 首都医科大学中医药学院,北京 100069)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤、六味地黄丸及合方对脑缺血大鼠学习记忆及海马轴突淀粉样前体蛋白 (APP)、生长相关蛋白 (GAP-43) 和突触素 (SYN) 表达的影响。方法:采用大脑中动脉永久性缺血模型,雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、补阳还五汤组、六味地黄丸组及合方组。造模后 48 h 开始灌胃给药,每天 1 次,补阳还五汤组每天灌胃 13 g·kg⁻¹,六味地黄丸组每天灌胃 9.1 g·kg⁻¹,合方组每天灌胃 22.1 g·kg⁻¹,模型组和假手术组每天灌胃等剂量的生理盐水。每组动物连续给药 30 d 后进行行为学检测。治疗 30 d 后,利用 Morris 水迷宫检测学习记忆功能;Western blot 检测轴突淀粉样前体蛋白 (APP) 及突触分子标志 SYN、GAP-43 蛋白的表达。结果:脑中动脉永久性缺血 30 d 后,空间参考记忆明显受损;补阳还五汤、六味地黄丸及合方均能不同程度提高大鼠空间参考记忆,特别是合方组大鼠在定位航行实验第 2 天的逃避潜伏期较模型组明显减少 ($P < 0.05$),补阳还五汤组和合方组大鼠穿环次数较模型组显著性增加 ($P < 0.05$);合方组大鼠首次穿越原平台所在位置时间也较模型组明显缩短 ($P < 0.01$)。脑缺血大鼠海马 APP 蛋白表达明显上调,GAP-43、SYN 蛋白明显减少,与假手术组差异显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);合方及补阳还五汤治疗可明显下调海马 APP 蛋白表达,上调海马 GAP-43、SYN 蛋白,较模型组有统计学差异 ($P < 0.05$);六味地黄丸组大鼠海马 APP 蛋白较模型组没有明显差异,海马 GAP-43、SYN 蛋白明显上调,差异显著 ($P < 0.05$)。结论:补阳还五汤与六味地黄丸合方治疗在减轻缺血脑区轴索损害,降低海马 APP 蛋白异常积聚的同时,可诱导 GAP-43、SYN 的合成而促进神经元突起再生,促进学习记忆功能的康复。

[关键词] 血管性痴呆;补阳还五汤;六味地黄丸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0161-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1129.052.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 11:29

[收稿日期] 20120304(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973782);北京市自然科学基金项目(7102014);北京市属高等学校人才强教深化计划“中青年骨干人才培养计划”项目(PXM2011014226);北京市教育委员会中医药与护理专项基金(10ZYH04)

[第一作者] 邢兆宏,医学硕士,副主任医师,从事中医药防治脑血管疾病的研究,Tel:13851206625, E-mail: xingzhaohong@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 张秋霞,副教授,医学博士,从事经方防治疑难杂病的现代研究,Tel:13436529869, E-mail: zqx26@163.com

[12] Sale E M, Sale G J. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(1): 113.

[13] Liberman Z, Eldar-Finkelman H. Serine 332 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 attenuates insulin signaling [J]. J Biol Chem, 2005, 280(6): 4422.

[14] Vander Haar E, Lee S I, Bandhakavi S, et al. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40 [J]. Nature Cell Biology, 2007, 9(3): 316.

[15] Saltiel A R, Kahn C R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. Nature, 2001, 414(6865): 799.

[16] 丁岩军. 蛋白酪氨酸磷酸酶-1B 与胰岛素抵抗及 2 型糖尿病的关系 [J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(6): 921.

[17] Zinker B A, Rondinone C M, Trevillyan J M, et al. PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 99(17): 11357.

[责任编辑 聂淑琴]

Effects of Buyang Huanwu Decoction Combined with Liuwei Dihuang Wan on APP Expression and Reconstruction of Neuron Synapses in Permanent Cerebral Ischemia Model in Rats

XING Zhao-hong¹, ZHANG Qiu-xia^{2*}, ZHAO Hui², ZHANG Qi², WANG Hai-zheng²

(1. Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Buyang Huanwu decoction combined with Liuwei Dihuang Wan on learning memory, amyloid precursor protein (APP), growth associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin SYP expression in permanent cerebral ischemia model in rats. **Method:** To establish the permanent middle cerebral artery model in rats. Male SD rats were randomly divided into five groups: normal group, model group, Buyang Huanwu decoction group, Liuwei Dihuang Wan group and combination group. After treatment for 30 days, Morris water maze was used to measure the learning memory, and the technology of Western blot was adopted to examine the expression of APP, SYN, GAP-43. **Result:** After the ischemia model was established for 30 days, the spatial memory was damaged obviously in model group. Buyang Huanwu decoction and Liuwei Dihuang Wan as well as the combination therapy could improve the spatial memory ability in different degrees. The escape latencies of the combination decoction were decreased significantly compared to the model group ($P < 0.05$) on the second day of position navigation test. On the fourth day of position navigation test, the escape latencies in Buyang Huanwu decoction group and the combination decoction group was decreased obviously ($P < 0.05$). In the spatial probe testing, the piercing number in Buyang Huanwu decoction group and the combination decoction group were increased significantly compared to the model group, the first time through the original plat of the combination decoction group was shorted remarkably compared to the model group ($P < 0.01$). Compared to sham group, the APP expression of the model group was increased significantly and the GAP-43 and SYN expression was descended obviously ($P < 0.01$, $P < 0.05$) while Buyang Huanwu decoction group and the combination decoction could decrease the APP expression and increase the GAP-43, SYN expression remarkably compared to the model group ($P < 0.05$). There was no statistical significance in the APP expression between Liuwei Dihuang Wan group and model group. The GAP-43 and SYN expression was increased obviously ($P < 0.05$). **Conclusion:** Buyang Huanwu decoction combined with Liuwei Dihuang Wan can alleviate the cerebral ischemia injury and reduce the abnormal APP accumulation. In addition, the combination decoction can reduce GAP-43 and SYN synthesis and promote regeneration of neurite, and promote the recovery of learning memory.

[Key words] vascular dementia; Buyang Huanwu decoction; Liuwei Dihuang Wan

认知功能障碍是脑缺血损伤最持久和最主要的后遗症^[1],是脑缺血急性期向血管性痴呆发展的移行过程,在此期进行的正确有效的治疗对于减缓痴呆的进程意义重大。益气活血法和补肾法是中医治疗脑血管疾病的常用治法^[2-3]。临床研究表明肾虚气弱血瘀是缺血后认知功能障碍的主要病机。本实验以益气活血法代表方补阳还五汤和补肾法代表方六味地黄丸为研究对象,研究益气活血法和补肾法对脑缺血后认知功能康复的作用及联合效应。并通过观察海马突触素(SYN)、生长相关蛋白-43(GAP-

43)、轴突淀粉样前体蛋白(APP)表达的变化,探讨其作用机制,旨在为血管性痴呆的防治提供新的治疗策略。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠,体质重280~300g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2006-0009。饲养在首都医科大学实验动物中心,许可证号SYXK(京)2005-0022。每3只动物生活在一个饲养笼,自由进食进水,12h光照/黑暗周期,环境温度(22 ± 1)℃。动

物在实验室适应 1 周后正式进行实验。

1.2 药物 根据 2005 年《中国药典》补阳还五汤药物组成:黄芪 60 g,赤芍 9 g,川芎 6 g,当归 9 g,地龙 9 g,桃仁 9 g,红花 9 g。六味地黄丸药物组成:熟地黄 24 g,山药 12 g,山萸肉 12 g,泽泻 10 g,丹皮 10 g,茯苓 10 g。药材购自北京同仁堂药店,经首都医科大学中药资源老师鉴定,符合 GAP 标准。由本实验室按常规方法制备,加水煎煮 2 次,每次 1 h,合并煎液,浓缩成含生药 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的汤剂。

1.3 试剂 Tis-组织蛋白抽提试剂、BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;兔抗鼠 SYN 单克隆抗体、兔抗鼠 APP 单克隆抗体、兔抗鼠 GAP-43 单克隆抗体、抗 GAPDH 单克隆抗体、羊抗兔 IgG 均购自 Epitomics 公司。

1.4 仪器 Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所研制),Labofuge 400R 低温离心机(德国 Heraeus),Multiskan MK3 型酶标仪(芬兰 Thermo BioAnalysis Company 产品)。DZF-6020 型真空干燥箱,生物显微镜(Nikon Eclipse 80i,日本),图像采集分析系统(NIS-Elements Basic Research,日本)。

2 方法

2.1 脑缺血大鼠模型制备 参照文献[4]制作大鼠中动脉永久性缺血模型。大鼠麻醉后,分离右颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),同侧颈总动脉永久结扎,于 ECA 与 ICA 分叉处作一切口,将制备好的线栓沿 CCA 顺行插入,插入深度为距动脉分叉 17~18 mm,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。动物入选的标准:动物麻醉清醒后出现对侧前肢倦曲或行走转圈体征则纳入,动物无此体征或于 2 h 后仍不清醒者弃去。

2.2 分组、给药方法 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 280~300 g,采用随机数字表法将大鼠随机分为 5 组,假手术组 10 只,模型组 15 只,补阳还五汤组 15 只,六味地黄丸组 15 只,合方组 15 只。造模后 48 h 开始 ig 给药,每天 1 次,补阳还五汤组 $13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,六味地黄丸组 $9.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,合方组 $22.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,模型组和假手术组 ig 等剂量的生理盐水。每组动物连续给药 30 d 后进行行为学检测。进入结果分析 44 只。

2.3 大鼠空间参考记忆能力测试 Morris 水迷宫检测学习记忆。Morris 水迷宫内壁涂成黑色,水深 30 cm,水温 $(19\pm 1)^\circ\text{C}$ 。平台直径 8 cm 隐藏于水面下 1 cm 处,利用行为记录系统软件追踪白色大鼠

在黑色背景下水迷宫中的运动轨迹、潜伏期、游泳速度及路径长度。整个实验过程分为定位航行实验和空间搜索实验两部分。定位航行实验:大鼠每天训练 2 轮,每轮 2 次,分别从平台相邻和相对象限放置大鼠,记录大鼠在 60 s 内成功进驻平台(大鼠找到平台并滞留其上 5 s 为成功进驻)所需时间(即逃避潜伏期)。空间探索实验:定位航行实验结束后,撤除平台,大鼠于平台对侧象限入水,观察其 30 s 内穿越平台所在位置的次数(穿环数)。

2.4 海马 APP 蛋白、SYN 蛋白、GAP-43 蛋白检测

每组随机取 5 只动物,Western blot 检测。大鼠断头处死,迅速在冰盒中分离海马组织,放置液氮;Tis-蛋白抽提试剂抽提海马组织蛋白,BCA 法蛋白定量;10%的 SDS-PAGE 凝胶电泳,上样量为 $10\text{ }\mu\text{g}$,电泳结束后,进行蛋白质转膜;与 GAP-43 一抗(1:10 000),SYN 一抗(1:30 000),APP(1:10 000)杂交反应;再将 NC 膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:12 000)杂交反应 1 h,在暗室进行 X-光胶片曝光、显影和定影。然后用同一张 NC 膜与内参 GAPDH 一抗(1:8 000)进行杂交反应,并获得蛋白印迹结果。X 胶片晾干后用 YLN-2000 凝胶影像分析系统扫描照片,目的蛋白吸光度和内参蛋白吸光度的比值,作为目的蛋白表达的相对水平。

2.5 统计方法 运用 SPSS 10.0 for windows 进行方差分析,LSD 检验比较两组间差异。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。 $P<0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤与六味地黄丸合方对脑缺血大鼠空间参考记忆的影响

3.1.1 定位航行实验 各组大鼠第 1 天游泳训练逃避潜伏期及游泳路径未见明显差异。从第 2 天游泳训练开始模型组大鼠搜寻隐藏平台的逃避潜伏期和游泳路径较假手术组明显延长($P<0.01$),提示脑缺血后大鼠存在明显的空间参考记忆获得能力障碍。合方组大鼠第 2 天寻找平台的时间明显比模型组大鼠减少($P<0.05$);补阳还五汤组与六味地黄丸组在第 3 天的游泳训练时段,寻找平台的逃避潜伏期也和模型组具有显著性差异($P<0.05$)。补阳还五汤组与合方组在第 4 天寻找平台的逃避潜伏期仍和模型组差异显著($P<0.05$),第 5 天各组大鼠寻找平台的逃避潜伏期趋于平稳,未见明显差异。见表 1。

表 1 各组大鼠在定位航行实验中平均逃避潜伏期的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	逃避潜伏期/ s				
			d 1	d 2	d 3	d 4	d 5
假手术	10	—	76.08 $\pm$ 24.79	50.22 $\pm$ 23.94 ²⁾	42.44 $\pm$ 18.55 ²⁾	37.51 $\pm$ 25.52 ¹⁾	30.93 $\pm$ 23.26
模型	8	—	84.32 $\pm$ 13.02	74.39 $\pm$ 19.26	58.93 $\pm$ 13.46	50.34 $\pm$ 21.54	32.38 $\pm$ 23.62
补阳还五汤	9	13	78.25 $\pm$ 19.75	71.35 $\pm$ 28.77	45.95 $\pm$ 22.34 ²⁾	36.30 $\pm$ 22.20 ¹⁾	33.22 $\pm$ 23.86
六味地黄丸	8	9.1	84.37 $\pm$ 14.71	74.28 $\pm$ 21.58	40.19 $\pm$ 17.74 ²⁾	41.47 $\pm$ 27.46	26.12 $\pm$ 14.97
合方	9	22.1	76.87 $\pm$ 21.52	55.93 $\pm$ 22.84 ¹⁾	44.26 $\pm$ 19.21 ²⁾	34.82 $\pm$ 25.84 ¹⁾	29.41 $\pm$ 26.77

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.1.2 空间搜索实验 经过训练后,撤离平台后,各组大鼠能在原平台所在范围有目的地寻找平台。但模型组大鼠首次穿越原平台所在位置的时间及穿越平台次数明显减少,较假手术组差异显著,说明脑缺血后空间记忆保持能力受到损害;各治疗组大鼠空间参考记忆均有不同程度的提高,特别是补阳还五汤组和合方治疗组准确穿越原平台所在位置的次数较模型组显著性增加($P < 0.05$);合方组大鼠首次穿越原平台所在位置的时间也较模型组明显缩短($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠空间探索能力比较($\bar{x} \pm s$)

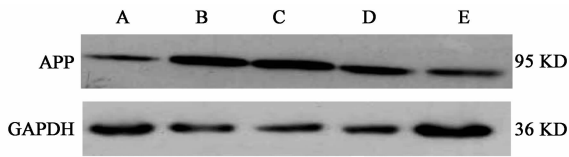
分组	<i>n</i>	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	穿环数 /次	首次穿环 时间/ s
假手术	10	—	1.13 $\pm$ 0.64 ¹⁾	2.19 $\pm$ 1.51 ²⁾
模型	8	—	0.60 $\pm$ 0.83	6.21 $\pm$ 5.40
补阳还五汤	9	13	1.27 $\pm$ 0.46 ¹⁾	3.52 $\pm$ 3.37
六味地黄丸	8	9.1	0.73 $\pm$ 0.88	4.45 $\pm$ 4.93
合方	9	22.1	1.2 $\pm$ 0.56 ¹⁾	2.32 $\pm$ 3.30 ²⁾

3.2 补阳还五汤与六味地黄丸合方对脑缺血大鼠海马 APP 蛋白表达的影响 脑缺血 30 d 后,海马 APP 蛋白表达较假手术组明显上调($P < 0.05$)。合方及补阳还五汤治疗可明显下调海马 APP 蛋白表达,较模型组差异显著($P < 0.05$)。见表 3,图 1。

表 3 各组大鼠海马 APP 蛋白的相对表达($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	<i>n</i>	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	APP/GAPDH
假手术	10	—	0.90 $\pm$ 0.21 ¹⁾
模型	8	—	1.26 $\pm$ 0.12
补阳还五汤	9	13	0.84 $\pm$ 0.20 ¹⁾
六味地黄丸	8	9.1	1.22 $\pm$ 0.23
合方	9	22.1	0.93 $\pm$ 0.26 ¹⁾

3.3 对脑缺血大鼠海马突触结构蛋白 SYN, GAP-43 表达的影响 脑缺血大鼠海马 GAP-43, SYN 蛋



A. 假手术组; B. 模型组; C. 六味地黄丸 $9.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D. 补阳还五汤 $13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; E. 合方组 $22.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (图 2~3 同)

图 1 Western blot 检测大鼠海马 APP 蛋白的表达

白较假手术组明显减少。六味地黄丸、补阳还五汤及合方均能明显上调海马 GAP-43, SYN 蛋白,与模型组差异显著。见表 4,图 2~3。

表 4 各组大鼠海马突触结构蛋白 SYN, GAP-43 的相对表达量($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	<i>n</i>	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	GAP-43 /GAPDH	SYN /GAPDH
假手术	10	—	1.20 $\pm$ 0.24 ²⁾	1.18 $\pm$ 0.19 ¹⁾
模型	8	—	0.74 $\pm$ 0.15	0.76 $\pm$ 0.11
补阳还五汤	9	13	1.18 $\pm$ 0.15 ¹⁾	1.26 $\pm$ 0.41 ¹⁾
六味地黄丸	8	9.1	1.12 $\pm$ 0.11 ¹⁾	1.18 $\pm$ 0.19 ¹⁾
合方组	9	22.1	1.30 $\pm$ 0.50 ²⁾	1.38 $\pm$ 0.42 ²⁾

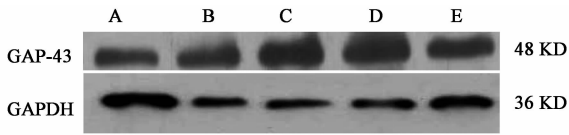


图 2 Western blot 检测大鼠海马 GAP-43 蛋白的表达

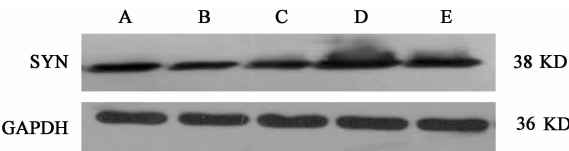


图 3 Western blot 检测大鼠海马 SYN 蛋白的表达

4 讨论

中医把脑缺血后的认知功能缺损命名为“中风痴呆”。益气活血是防治缺血性脑中风的根本途径和重要方法。研究表明肾精亏虚,脑髓消减是认知功能障碍产生发展的根本原因。以肾虚为核心的基础证候,几乎贯穿脑缺血后认知功能障碍证候演变

与病程始终^[5-7]。脑缺血导致的认识功能障碍其病机虚实夹杂,病程较长,一病一方往往药力单薄。补阳还五汤作为益气活血法治疗脑缺血的经典方剂被临床广泛应用。六味地黄丸作为补肾的代表方常被临床用于防治认知功能障碍。本研究在观察补阳还五汤和六味地黄丸防治脑缺血后学习记忆功能损伤的同时,将两方合用,研究其作用及机制,结果显示合方的作用明显优于单方组。

APP 是正常神经元跨膜糖蛋白,由快速轴突运输转运,它的蓄积标志着轴突功能障碍及损伤^[8]。缺血损伤导致细胞轴浆流动停止、细胞骨架崩溃是 APP 在局部聚积的主要原因,大量聚积的 APP 蛋白水解途径趋向淀粉样蛋白生成途径,导致 β 淀粉样蛋白($A\beta$) 在细胞内的异常增多, $A\beta$ 沉积物可以破坏脑血管,引起血管性痴呆和认知障碍^[9]。在实验中我们注意到补阳还五汤改善脑缺血大鼠学习记忆功能的作用优于六味地黄丸。合方治疗与补阳还五汤均可明显下调脑缺血大鼠 APP 蛋白表达,而六味地黄丸对 APP 蛋白没有明显的调节作用,提示补阳还五汤可有效地阻抑脑缺血导致的轴索损伤,促进轴突损伤后的修复,与改善学习记忆功能关系密切。脑缺血后神经功能恢复很大程度上取决于神经元轴突再生、新生的轴突形成突触联结。SYN 作为突触重塑的特异性分子标志物,与神经递质释放、突触囊泡再循环和突触发生等都有密切关系^[10-11]。脑缺血时 GAP-43 的表达是评估轴突再生的重要指标^[12]。本研究提示补阳还五汤、六味地黄丸及合方治疗可有效诱导神经元生长相关蛋白(GAP-43)合成,对脑缺血后轴突再生有促进和维持作用,通过调节突触素的表达,促进突触结构的再建。

综上,补阳还五汤与六味地黄丸合方治疗在降低 APP 异常积聚的同时,可诱导神经元生长相关蛋白(GAP-43)、突触素的合成而促进神经元突起再生,实现了损伤脑区及关联脑区良好的神经元可塑性变化,促进学习记忆功能的康复。

[参考文献]

[1] 王艳,唐强,李娟. 脑卒中后认知功能障碍及治疗的

研究进展[J]. 中国康复医学杂志,2008,23(2):182.
[2] 俞兵河,沈泽敏. 益气活血补肾法中药治疗缺血性中风恢复期 46 例疗效观察[J]. 中华中医药杂志,2009,24(6):829.
[3] 张林,孙宏伟,马贤德,等. 不同黄芪剂量的补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血清 IL-1,IL-6,IL-10 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(10):62.
[4] 田金洲. 血管性痴呆[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:598.
[5] 易健,刘柏炎,蔡光先. 超微六味地黄汤对老年痴呆大鼠认知功能和脑组织碱性成纤维生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):139
[6] 朱坤杰,孙建宁. 六味地黄丸对 D-半乳糖所致衰老大鼠学习记忆的改善作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,12(8):44.
[7] 莫霄云. 中医对轻度认知功能障碍的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(7):219.
[8] Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity [J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(11): 889.
[9] Valeriani V, Dewar D, McCulloch J. Quantitative assessment of ischemic pathology in axons, oligodendrocytes, and neurons: attenuation of damage after transient ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20:765.
[10] Dahlqvist P, A Rönnbäck, S A Bergström, et al. Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats [J]. Eur J Neuroscience, 2004, 19(8): 2288.
[11] Derksen M J, Ward N L, Hartle K D, et al. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis [J]. Neurobiol Learn, 2007, 87(3): 404.
[12] Takei H, Buckleair L W, Rivera A, et al. Brain tissue microarrays in neurodegenerative diseases: validation of methodology and immunohistochemical study of growth-associated protein-43 and calretinin[J]. Pathol, 2007, 57(12): 775.

[责任编辑 聂淑琴]