

脑灵汤对 AD 模型大鼠行为学及海马内 APP mRNA 表达的影响

何明大* 罗红波 张四方

(中南大学湘雅二医院中医教研室,长沙 410011)

[摘要] 目的 观察脑灵汤对 Alzheimer 病(AD)模型大鼠行为学及脑内海马部位 β -淀粉样前体蛋白(APP) mRNA 影响。方法 以 D-半乳糖腹部注射合并铝盐皮下注射制作 AD 大鼠模型,行 γ -电迷宫实验检测学习记忆能力及 RT-PCR 法观察大鼠脑内海马 APP mRNA 的变化。结果 脑灵汤治疗 30 d 后大鼠学习记忆能力较模型组和对照组明显增强($P < 0.05$);大鼠脑内海马部位 APP 基因 mRNA 表达的水平亦较模型组和对照组明显降低($P < 0.05$)。结论 脑灵汤抑制和下调 APP mRNA 表达的水平,减少海马结构中 β -淀粉样蛋白的沉积,是改善模型大鼠学习记忆的作用机制之一。

[关键词] Alzheimer 病; 脑灵汤; 行为学; β -淀粉样前体蛋白

[中图分类号] R742

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-7347(2006)01-0060-03

Effect of naoling decoction on the behavior and the mRNA expression of β -amyloid precursor protein in the hippocampus in rats with Alzheimer's disease

HE Ming-da*, LUO Hong-bo, ZHANG Si-fang

(Department of Traditional Chinese Medicine, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of naoling decoction (NLD) on the behavior and the mRNA expression of β -amyloid precursor protein (APP) in the hippocampus in rat model with Alzheimer's disease (AD). **Methods** D-galactose was intra-abdominally injected and $AlCl_3$ was hypodermically injected to build the AD models. The behavior of rats was measured by γ -electric maze and the level of APP mRNA in the model rat hippocampus was observed by RT-PCR. **Results** The learning and memory capacity in the NLD group was improved and the APP mRNA expression level was significantly lower in the NLD group compared with the untreated model and the control group (All $P < 0.05$). **Conclusion** NLD can lower the expression of APP mRNA to reduce β -amyloid protein deposition of rat hippocampus, which may be one of the mechanisms of improving the learning and memory capacity of AD model rats.

Key words: Alzheimer's disease; naoling decoction; ethology; β -amyloid precursor protein

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006 31(1) 0060-03]

Alzheimer 病(Alzheimer's disease, AD)又称老年性痴呆,是一种老年性神经系统退行性疾病,主要病理学特征之一是脑组织中出现大量老年斑^[1]。 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $A\beta$)是老年斑的主要成分。 $A\beta$ 来自一个跨膜糖前体蛋白— β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, APP)^[2]。研究

发现,APP 的过度表达及异常途径的裂解可能是 $A\beta$ 沉积形成及 AD 发病的始动因素^[3],因此抑制和减少 APP 的过度产生是治疗的重要环节。为此,笔者观察了脑灵汤对 AD 模型大鼠脑内海马组织 APP 基因 mRNA 表达的影响,旨在探讨中医药防治 AD 的途径和措施。

*收稿日期 2005-01-11 作者简介:何明大(1949-),男,湖南长沙人,主任医师,主要从事老年性神经系统疾病的中西医结合治疗。

* 通讯作者, E-mail: hemingda@sohu.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 选用健康 4 月龄 SD 大鼠(中南大学实验动物中心提供),雌雄各半,体质量 250~350 g。先对所有大鼠进行迷宫训练,筛选出学习记忆正常的大鼠,再随机分为对照组、模型组、中药组、西药组。

1.1.2 主要试剂和药物 $AlCl_3$,D-半乳糖系长沙化学试剂厂出品($AlCl_3$ 用蒸馏水配制成 10 g/L 的水溶液备用);RNA 聚合酶提取剂(Trizol Reagent 试剂盒)、第一链 cDNA 合成试剂盒、Taq DNA 聚合酶均购自美国 MBI 公司;琼脂糖系美国 Sigma 公司产品。脑灵汤浓缩液,由杜仲、菖蒲、补骨脂、红景天、白参、淫羊藿等 8 味药组成,湘雅二医院制剂科配制(根据体质量按成人剂量 10 倍,每毫升成药液含生药 2.5 g);脑复康(吡拉西坦,用蒸馏水配制成 4 g/L 的水溶液)系双鹤药业产品。

1.2 方法

1.2.1 行为学测试 采用 γ -电迷宫检测学习记忆能力,规定大鼠受电击后从起步区直接跳至安全区为正确反应,否则为错误反应。所需的电击次数表示其学习记忆的获得能力,记录每只大鼠学会逃避电刺激次数,以 30 次为最大值计数。行为学测试于 AD 模型建立前后及脑灵汤/脑复康处理前及处理 20 d 和 30 d 后进行。

1.2.2 模型建立及给药 对照组注射等量生理盐水,模型组及各用药组大鼠腹腔注射 D-半乳糖 60

mg/kg,造成亚急性衰老,皮下注射 $AlCl_3$ 100 mg/kg,每日 1 次,共 45 d,诱导建立 AD 模型;模型建立成功与否标准参考钱亦华等人^[4]的方法。对照组和模型组用 1 mL/d 的蒸馏水灌胃;中药组用所配脑灵汤药液分别按 1 mL/d 灌胃;西药组用脑复康药液按 200 mg/(kg·d)灌胃,共 30 d。

1.2.3 RT-PCR 法半定量检测大鼠脑海马组织 APP mRNA 水平的变化 RT-PCR 引物序列:APP(295 bp),正义链 5'-GGATCGGAGTTCGGACATG-3',反义链 5'-GTTCTGACTCTGCTCAAAG-3';内参照 G3PD(100 bp),正义链 5'-GGCTGTGTTGTCCCCTGTAT-3',反义链 5'-CCGCTCATTGCCGATAGTG-3'。

大鼠脑组织总 RNA 的抽提及 RT-PCR 反应按试剂盒说明书操作。扩增条件 94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,60 °C 45 s,72 °C 1 min,共 38 个循环,72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,于紫外投射灯下观察结果并拍照。

1.3 统计学处理 所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,样本之间的显著性检验应用 SPSS 11.0 软件进行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 γ -电迷宫检查行为学改变 模型组和对照组比较,大鼠所需电刺激次数增加($P < 0.05$),中药组治疗 30 d 后学会躲避所需的电刺激次数减少($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组大鼠电迷宫实验学习记忆能力测试比较($\bar{x} \pm s$, 次)

组别	n	制模前	制模后	灌药后 20 d	灌药后 30 d
对照组	12	17.95 \pm 3.66	17.85 \pm 3.96	17.12 \pm 2.12	18.13 \pm 4.15
模型组	12	17.15 \pm 4.20	24.10 \pm 3.82*	25.12 \pm 3.46*	24.98 \pm 1.73*
中药组	12	16.15 \pm 5.07	23.40 \pm 4.63*	21.43 \pm 5.26*	19.53 \pm 0.28* Δ
西药组	12	18.10 \pm 1.02	24.42 \pm 2.01*	23.39 \pm 1.49*	24.10 \pm 2.47*

与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, Δ $P < 0.05$

2.2 鼠脑海马区域 APP mRNA 水平的变化 将 RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,分别扩增出 297 bp (APP)和 100 bp (G3PD)两条带(图 1)。进一步进行图像分析显示(表 2),与正常组比较,模型组鼠脑海马区域 APP mRNA 水平显著提高;与模型组比较,中药组 APP mRNA 水平有明显的下降。西药组 APP mRNA 的变化不明显。

表 2 各组大鼠海马组织 APP mRNA 水平半定量分析

组别	n	APP/G3PD (%)
对照组	10	0.08 \pm 0.02
模型组	10	0.37 \pm 0.01*
中药组	10	0.19 \pm 0.02* Δ
西药组	10	0.31 \pm 0.03*

与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, Δ $P < 0.05$

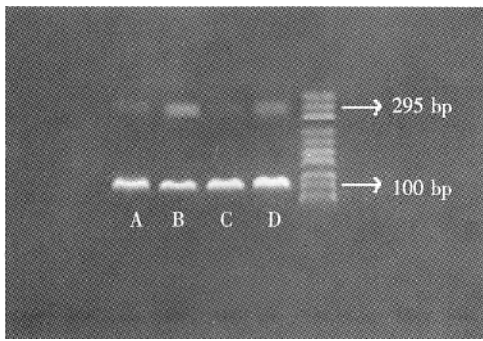


图1 海马区域 APP 基因的 mRNA 表达 A:对照组;B:模型组;C:中药组;D:西药组

Fig.1 APP mRNA expression of hippocampus A: Control group; B: Model group; C: Naoling decoction; D: Piracetan

3 结 论

AD 是一种常见的老年性退行性疾病。细胞内 APP 在 β -分泌酶和 γ -分泌酶协同作用下使 APP C 端断裂,产生约含 39~43 个氨基酸片段称为 $A\beta^{[5]}$,它是 AD 患者脑内一种特有蛋白,在神经元中和突触间的沉积是导致 AD 患者痴呆的最重要的原因,可引起学习记忆减退,认知障碍等^[6]。实验研究表明 APP 的过度表达能引起神经元病变,如致离体实验中神经元样细胞死亡及在体研究中实验动物脑内出现淀粉样物质沉积的认知损害^[7]。因此可以设想,如果能有效地防止或逆转由 APP 表达过多而引起的神经毒性,可能对 AD 的防治具有一定意义。

中医目前多将此病归于“神呆”范畴。认为其病位在脑,与心、肝、肾功能失调关系密切^[8]。发病以内因为主,气、血、痰、瘀缠结为患。脑髓空虚,气血不足致心神失养,属本虚标实之疾^[9]。因肾藏精,生髓通脑,故中药多以补肾填精为主,辅以活血化瘀,理气化痰。临床治疗可延缓病情发展、明显改善 AD 患者的生活质量^[10~14]。秦嘉^[15]用通窍活血汤治疗此类患者 59 例,疗效满意;周如倩等^[16]用补肾中药为主治疗 AD 38 例,总有效率为 51.28%。因此中药防治 AD 优势明显,有必要开展补肾活血治疗 AD 的机制研究。

回顾过去有关补肾活血法的研究及 AD 中医病因病机特点^[17],并根据我科(中南大学湘雅二医院中医科)教授临床经验,组成由杜仲、补骨脂、红景天等药的脑灵汤,其组方符合补肾活血治疗 AD 的中医证治原则。笔者通过铝造模,探讨脑灵汤防治 AD 的作用机制。行为学测试结果显示脑灵汤治疗 1 个月后 AD 大鼠受电击次数较对照组明显减少,表明 AD 大鼠的学习记忆状况有明显改善,提示脑灵汤可恢复 AD 模型大鼠的记忆缺损。海马是获取和巩固信息有关回路的一个重要组成部分,特别是近事记忆,因此海马参与储存记忆的神经过程^[18]。进一步

用 RT-PCR 法检测大鼠脑内海马部位 APP mRNA 表达变化,结果发现 AD 模型大鼠脑海马部位 APP mRNA 的表达水平显著增高,而中药组 APP mRNA 的水平有明显的下降,其作用的生物学基础可能是脑灵汤通过抑制 APP 的产生,减少 $A\beta$ 的脑内的沉积,从而改善 AD 模型大鼠学习记忆能力。结合行为学测试结果,笔者认为脑灵汤对 AD 模型大鼠的治疗作用是通过下调 APP 基因表达,减少 APP 的生成,导致其剪切后的产物 $A\beta$ 生成降低,使 $A\beta$ 沉积下降,从而减轻老年斑的生成。因此,脑灵汤具有神经元保护作用,有利于改善 AD 患者的记忆能力,达到防治 AD 的目的。

参考文献:

- [1] 王德生,张守信.老年性痴呆[M].北京:人民卫生出版社,2002.28-32.
- [2] Bayer TA, Wirths O, Majtenyi K, et al. Key factors in Alzheimer's diseases: beta-amyloid precursor protein processing. *Metabolism and intraneuronal transport*[J]. *Brain Pathol*, 2001, 11(1):1-11.
- [3] 祁金顺. β 淀粉样蛋白的神经毒性与跨膜离子转运[J]. *神经解剖学杂志* 2000, 16(2):163-167.
- [4] 钱亦华,胡海涛,杨杰.鼠脑铝含量分析及其在学习记忆改变的研究[J]. *微量元素与健康研究*, 1997, 14(3):11-14.
- [5] Maccioni BR, Munoz PJ, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases[J]. *Arch Med Res*, 2004, 32(6):81.
- [6] Nakayama T, Sawada T. Involvement of microtubule integrity in memory impairment caused by colchicines[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 71(1-2):119-138.
- [7] Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, et al. Tau aggregation in the hippocampal formation: an aging or a pathological process? [J]. *Exp J Gerontol*, 2002, 37(10-11):1291-1296.
- [8] 李海涛,曾莉.祖国医学以老年痴呆症的认识与研究[J]. *中国药理学* 2004, 3(6):12.
- [9] 傅喆敏,黄宝康.补肾中药防治老年痴呆症研究进展[J]. *时珍国医国药* 2003, 23(1):32-34.
- [10] 郭芬云,张映梅.补肾益脑为主治疗老年性痴呆[J]. *云南中医学院学报* 2003, 26(1):40-41.
- [11] 康雁,易志宏,王丽.自拟扶智汤治疗老年痴呆症 23 例疗效观察[J]. *中医药学报* 2000, 2(4):6.
- [12] 张维颖.补肾健脑法治疗中风痴呆 56 例[J]. *陕西中医*, 1999, 20(1):12.
- [13] 俞兵和.益肾活血中药治疗老年性痴呆 19 例[J]. *浙江中医杂志*, 1992, 27(1):18.
- [14] 阎乐法.聪脑汤治疗老年痴呆临床研究[J]. *山东中医杂志*, 1997, 16(11):499-500.
- [15] 秦嘉.通窍活血汤治疗老年性痴呆 59 例临床观察[J]. *北京中医*, 1997, 16(5):12.
- [16] 周如倩,林水森,王健,等.补肾方改善阿尔茨海默病患者生活能力的研究[J]. *现代康复* 2001, 5(35):36.
- [17] 沈施德.补肾活血法的研究现状与思路[J]. *中国中医基础医学杂志* 2001, 7(5):15.
- [18] Delacourte A, Buee L. Tau pathology: neurodegenerative disorders [J]. *Curr Opin Neuro*, 2002, 13(7):371-376.