

六味地黄丸通过RAGE/LRP1受体介导对SAMP8小鼠 脑微血管的调节作用

贾亚泉, 宋军营, 袁永, 李俊霖, 丁蕊, 张振强*
(河南中医药大学 中医药科学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨六味地黄丸对SAMP8小鼠神经血管单元损伤的保护作用。方法:将75只6月龄SAMP8小鼠作为肾精不足证阿尔茨海默病(AD)动物模型,设模型组、盐酸多奈哌齐($0.747\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组、六味地黄丸高、中、低剂量(2.700 、 1.350 、 $0.675\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组,每组15只,以SAMR1小鼠15只作为正常组,连续给药2个月。采用Morris水迷宫检测小鼠空间记忆能力;苏木素-伊红(HE)观察脑组织海马和皮层病理变化;免疫组化(IHC)法检测脑组织海马和皮层中 β 淀粉样蛋白($A\beta$)沉积情况及血管性血友病因子(vWF)和CD34表达情况;电镜观察脑微血管超微结构变化情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织海马和皮层中晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、低密度脂蛋白相关蛋白1(LRP1)、血管内皮生长因子A(VEGF-A)和P-选择素(P-selection)蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期、游泳路程显著延长($P<0.01$),神经胶质细胞数量增多,神经细胞数量减少,脑微血管内皮细胞间隙紧密连接模糊或间隙变大,膜结构损伤较重,内皮细胞线粒体肿胀、膜破裂、嵴大部分溶解,海马和皮层组织中 $A\beta$ 、vWF蛋白表达显著增加($P<0.01$),CD34蛋白表达明显降低($P<0.05$),皮层中RAGE和P-selection蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),LRP1和VEGF-A蛋白表达水平显著下降($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄丸各剂量组小鼠逃避潜伏期、游泳路程均明显缩短($P<0.05$),皮层和海马中神经胶质细胞数量减少明显,皮层中微血管数量增多明显,微血管内皮细胞间隙紧密连接双层膜结构较清晰,线粒体数量增多、膜完整、线粒嵴恢复,海马和皮层中 $A\beta$ 、vWF、RAGE和P-selection蛋白表达明显降低($P<0.05$),CD34、LRP1和VEGF-A蛋白表达明显升高($P<0.05$)。结论:六味地黄丸能够通过RAGE/LRP1受体系统调节 $A\beta$ 代谢,通过抑制vWF表达和增加VEGF-A和CD34促进脑微血管新生,改善SAMP8小鼠脑微血管损伤。

[关键词] 六味地黄丸; 阿尔茨海默病; 神经-血管单元; 皮层中晚期糖基化终末产物受体(RAGE); 低密度脂蛋白相关蛋白1(LRP1)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)16-0009-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220804

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220211.0949.001.html>

[网络出版日期] 2022-02-11 16:22

Liuwei Dihuangwan Regulate Brain Microvessels in SAMP8 Mice Through RAGE/LRP1 Receptors

JIA Yaquan, SONG Junying, YUAN Yong, LI Junlin, DING Rui, ZHANG Zhenqiang*
(Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine,
Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Liuwei Dihuangwan on neurovascular injury in SAMP8 mice. **Method:** The Alzheimer's disease (AD) model with insufficiency of kidney essence was

[收稿日期] 2021-12-15

[基金项目] 国家自然科学基金联合基金项目(U1504829);中原科技创新领军人才项目(204200510022);河南省高校科技创新团队支持计划项目(21IRTSTHN026);河南省中医药科学研究专项重点课题(2018ZY1009);河南中医药大学苗圃工程项目(MP2020-12)

[第一作者] 贾亚泉, 硕士, 实验师, 从事中西医结合防治脑病基础与临床研究, E-mail: jiayaquan@126.com

[通信作者] *张振强, 博士, 教授, 从事中西医结合防治脑病基础与临床研究, E-mail: zhang_zhenqiang@126.com

induced in 75 SAMP8 mice aging 6 months. The model mice were divided into model group, positive control group (donepezil hydrochloride, $0.747 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and high-, medium-, and low-dose Liuwei Dihuangwan groups ($2.700, 1.350, 0.675 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), with 15 mice in each group. Fifteen SAMR1 mice were assigned to a normal control group. All mice were administered continuously for 2 months. The spatial memory of mice was tested by the Morris water maze. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the hippocampus and cortex of brain tissues. The immunohistochemical method (IHC) was used to detect the deposition of amyloid β -protein ($A\beta$) and the expression of von Willebrand factor (vWF) and CD34 in the hippocampus and cortex of brain tissues. Electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes in cerebral microvessels. Western blot was used to detect the protein expression levels of the receptor of advanced glycation endproduct (RAGE), low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), and P-selection in the hippocampus and cortex of brain tissues. **Result:** Compared with the normal control group, the model group showed prolonged escape latency and swimming distance ($P < 0.01$), increased number of glial cells, decreased number of nerve cells, blurred tight junctions or enlarged gap of the brain microvascular endothelial cells, severely injured membrane structure, swollen mitochondria of endothelial cells, ruptured membrane, massive dissolution in cristae, increased protein expression of $A\beta$ and vWF in the hippocampus and cortex ($P < 0.01$), reduced protein expression of CD34 ($P < 0.05$), elevated protein expression of RAGE and P-selection in the cortex ($P < 0.01$), and decreased protein expression level of LRP1 and VEGF-A ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Liuwei Dihuangwan groups showed shortened escape latency and swimming distance ($P < 0.05$), reduced number of glial cells in the cortex and hippocampus, increased number of microvessels in the cortex, clear double-layer membrane structure in tight junctions between the microvascular endothelial cells, increased number of mitochondria with intact membrane and recovered mitochondrial cristae, decreased protein expression of $A\beta$, vWF, RAGE, and P-selection in the hippocampus and cortex ($P < 0.05$), and increased protein expression of CD34, LRP1, and VEGF-A ($P < 0.05$). **Conclusion:** Liuwei Dihuangwan can regulate $A\beta$ metabolism through the RAGE/LRP1 receptor system and promote cerebral microvascular angiogenesis by inhibiting vWF expression and increasing VEGF-A and CD34, thereby improving cerebral microvascular injury in SAMP8 mice.

[Keywords] Liuwei Dihuangwan; Alzheimer's disease (AD); neurovascular unit; receptor of advanced glycation endproduct (RAGE); low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)

阿尔茨海默病(AD)是多个脑区域中的一种慢性神经变性疾病,其特征主要以脑组织中 β 淀粉样蛋白($A\beta$)沉积形成的老年斑(SP)和tau蛋白异常磷酸化导致的神经元纤维缠结(NFTs)为主,临床表现为记忆力减退,认知功能障碍,视空间能力不足,失语失用以及人格行为改变等^[1-3]。现代医学研究表明,生理条件下外周和中枢内 $A\beta$ 水平保持平衡^[4]。若脑内 $A\beta$ 清除功能下降,导致 $A\beta$ 在脑内堆积,则引发突触功能异常、神经元凋亡等多种病理反应,基于此病理特征改变提出的“血管假说”理论,认为脑微血管内皮细胞(BMEC)在 $A\beta$ 代谢与转运过程中起着重要作用^[5-7]。微血管功能障碍被认为是AD发病机制的重要组成部分之一。 $A\beta$ 在BMEC上的主要转运受体包括晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、低密度脂蛋白相关蛋白1(LRP1)和P-糖蛋白

(P-gp)^[8-9]。血管内皮生长因子(VEGF)维持脑BMEC功能完整性,可以认为BMEC通过自身的分泌功能而维系脑微环境稳定和改善病理状态下的微环境以保护神经元。近些年来,研究表明RAGE是一种位于细胞表面分子免疫球蛋白超家族上的多配体受体,参与了人类神经功能障碍和死亡的发病机制^[10-11]。最近一项研究表明, $A\beta$ 跨血脑屏障的异常易位对AD起着至关重要的作用^[12]。RAGE是调节 $A\beta$ 流入的重要转运蛋白,而 $A\beta$ 的流出是由LRP1实现的^[13-16]。 $A\beta$ 产量的增加是由多种原因引起的;清除率降低导致 $A\beta$ 在脑实质内蓄积,老年斑的形成是AD发生的基本过程^[17]。

神经血管单元(NVU)是以神经元(NE)、星形胶质细胞(AS)、脑微血管内皮细胞(BM)为主体,构成一个结构互通的共生性功能整体,用于维护脑内

环境稳定和大脑正常功能^[18]。六味地黄丸出自北宋名医钱乙的《小儿药证直诀》，是“补肾填精”经典名方，具有抗炎抗氧化及保护神经细胞的作用。前期研究表明，六味地黄丸通过调节血管内皮生长因子 VEGF 保护 $\alpha\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞的损伤^[19]。中医认为痴呆发病与肾、心、脾、肝等脏腑功能失调密切相关。因肾精生髓通于脑，若肾精亏耗，髓海不足，脑元失养而“肾精不足”致呆^[20]。本文在此中医病机理论指导下，以补肾填精，解郁散结治法，通过 SAMP8 小鼠 AD 动物模型 RAGE/LRP1 受体系统确定六味地黄丸在 AD 神经血管单元中的保护作用，并为 AD 治疗寻找可靠的靶点。

1 材料

1.1 动物 6月龄 SPF 级雄性 SAMP8 快速老化小鼠 75 只和其同源正常老化 SAMR1 小鼠 15 只，体重质量 (30±5)g，购自北京华阜康实验动物有限公司，生产合格证号 SCXK(京)2020-0004，动物质量合格证号 37009200004690。动物购回后饲养于河南中医药大学动物实验中心，使用许可证号 SYXK(豫)2021-0015，期间自由饮食，饲养温度控制在 (22±1)℃，相对湿度 (45±5)%，照明每 12 h 明暗交替 1 次。本实验通过河南中医药大学实验动物福利伦理委员会审查批准，涉及实验动物研究内容和过程均符合国家对医学实验动物的相关要求，伦理审查编号 DWLL201903268。

1.2 药物 六味地黄丸(河南宛西制药股份有限公司，批号 18110401)，盐酸多奈哌齐[卫材(中国)药业有限公司，批号 1701069]。参照《中药药理实验方法》计算给药量，将六味地黄丸溶于生理盐水中制成悬浮液，六味地黄丸每 8 丸相当于原生药材 3 g。以成人每日剂量为中剂量，根据人与小鼠体表面积折算，即 $1.350 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，高剂量为中剂量的 2 倍即 $2.700 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，低剂量为中剂量的 1/2 倍即 $0.675 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，阳性药盐酸多奈哌齐的给药剂量折算方法同上，即 $0.747 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每日 1 次，正常组和模型组给予同等体积的生理盐水，连续治疗 2 个月。

1.3 试剂 伊红染色液、苏木素染色液、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio 公司，货号分别为 G1100、G1140、R0020、PC0020)； $\alpha\beta$ 抗体(英国 Abcam 公司，货号 ab201060)；血管性血友病因子(vWF)、P-选择素(P-selection)一抗(美国 Proteintech 公司，货号分别为 11778-1-AP、60322-1-Ig)、CD34、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(比

利时 Abways 公司，货号分别为 CY5196、AB0037)；辣根过氧化物酶(HRP)标记多克隆抗体抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体、HRP 标记羊抗小鼠 IgG、HRP 标记羊抗兔 IgG、RAGE 抗体(美国 Boster 公司，货号分别为 SV0002、BA1050、BA1055、BA1789)；LRP1 抗体(美国 Epito Mics 公司，货号 2703-1)；VEGF-A 抗体(美国 Gene Tex 公司，货号 GTX102643)。

1.4 仪器 BX61 型显微镜(日本 Olympus 公司)；EM UC7 型超薄切片机、DM500B 型光学显微镜(德国 Leica 公司)；FA/JA-B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)；Mini-Protean Tetra 型电泳转膜仪、Chemidoc MP 型自动凝胶成像系统、P3000 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)；JEM-1400 型透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 动物分组 将 15 只 SAMR1 小鼠设为正常组；75 只 SAMP8 小鼠，适应性饲养 1 周后，按随机数字表法分为 5 组，分别为模型组、阳性药盐酸多奈哌齐组、六味地黄丸高、中、低剂量组，每组 15 只。

2.2 给药 在适应性饲养结束后第 2 天开始，每天上午 9 点进行灌胃给药，每次灌胃量按 $300 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行换算。其中，正常组和模型组给予等体积生理盐水，六味地黄丸高、中、低剂量组给予六味地黄丸溶液，阳性药组给予盐酸多奈哌齐，连续给药 2 个月。

2.3 Morris 水迷宫检测 给药 2 个月后进行水迷宫测试，测试期间每天继续给药。将各组动物于 Morris 水迷宫中连续定位航行训练 4 d，每次均从第 1 象限至第 4 象限的 4 个入水点顺序面向池壁放入水中，记录小鼠找到隐藏在水下平台的时间，即逃避潜伏期，若小鼠在 60 s 之内未找到平台则将其引导到平台上并停留 15 s 结束训练。每只小鼠每天训练 4 次，取其平均值作为该小鼠当天的平均逃避潜伏期，连续训练观察 5 d，以第 5 天的平均逃避潜伏期进行比较。潜伏期越短，路程越近，说明大鼠学习记忆能力越好。

2.4 动物组织采集和处理 动物于样品采集前禁食 12 h，在末次灌胃 2 h 后，取 10 只腹腔注射麻醉，背位固定，剪开胸腔，充分暴露心脏，进行心脏灌注。灌注后断头取出全脑，除去小脑，剥离出皮层和海马，取 5 只将皮层和海马分别浸泡在 4% 多聚甲醛溶液中，24 h 更换一次固定液，固定后石蜡包埋、切片、片厚 $4 \mu\text{m}$ ，并进行 HE 染色，显微镜下观察脑组织的病理变化，并随机选取 5 个视野，用 Image Pro Plus 图像分析系统进行计数分析；另 5 只将皮层

和海马分别切成1 mm×1 mm×1 mm大小,用2.5%~4%的戊二醛固定,2 h后更换固定液。取余下5只快速断头,取出全脑,除去小脑,剥离出皮层和海马,以液氮快速冷冻后于-80 °C保存,提取蛋白及RNA。

2.5 免疫组化法检测脑组织A β 沉积、vWF和CD34的表达情况 取各组小鼠海马和皮层切片进行脱蜡、抗原修复、过氧化物酶结合、抗原封闭,分别孵育一抗(1:500)及HRP标记的二抗(1:5000),使用DAB显色,苏木素复染,脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。显微镜下观察,用Image Pro Plus图像分析系统进行分析,镜下随机于大脑海马(A β)、皮层(A β 、vWF和CD34)中各取5个视野,测出平均积分吸光度AA。

2.6 电镜观察脑微血管超微结构变化情况 取用2.5%~4%的戊二醛固定的皮层和海马组织,漂洗,1%锇酸固定2 h后,漂洗,50%、70%、100%丙酮梯度脱水,按1:1配制丙酮:812树脂混合液浸透2 h,纯812树脂浸透4 h,812树脂包埋,聚合,超薄切片,醋酸双氧铀染色,柠檬酸铅染色。透射电镜观察并

摄片。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织RAGE、LRP1、P-selection和VEGF-A蛋白表达 提取海马和皮层总蛋白,加入上样缓冲液后煮沸变性,SDS-PAGE电泳,转膜,封闭,分别4 °C孵育相应一抗(1:1000)过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000),室温孵育1 h,ECL试剂发光及显影。采用Image Pro Plus 6.0软件测定各个条带的灰度值,以目的条带与GAPDH条带的灰度比值表示所测蛋白的相对表达水平。

2.8 统计学方法 采用SPSS 19.0软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠空间学习记忆能力比较 与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期、游泳路程显著延长($P<0.01$)。与模型组比较,六味地黄丸各剂量组和盐酸多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期、游泳路程均明显缩短($P<0.05$)。见表1、图1。

表1 六味地黄丸对AD小鼠逃避潜伏期、游泳路程的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on escape latency and swimming distance in AD mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s	游泳路程/cm
正常组		24.20±2.89	175.60±10.03
模型组		53.60±5.72 ¹⁾	296.80±13.45 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	31.70±3.13 ²⁾	208.90±10.95 ²⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	32.50±3.45 ²⁾	216.70±10.74 ²⁾
六味地黄丸中剂量组	1.350	36.90±4.04 ²⁾	235.80±11.56 ²⁾
六味地黄丸低剂量组	0.675	40.30±4.66 ²⁾	250.40±11.88 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表2和表4同)

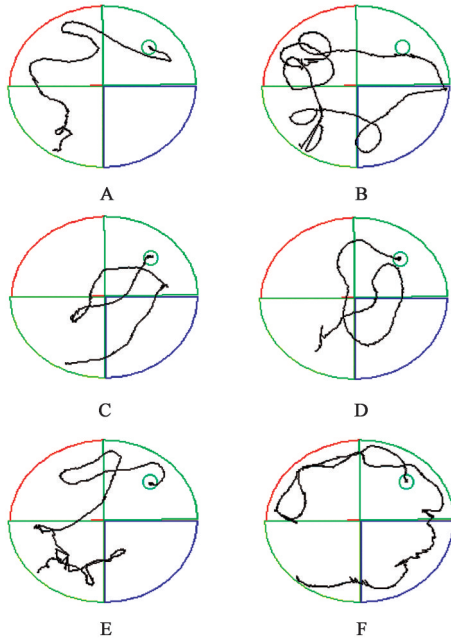
3.2 对AD小鼠脑组织海马和皮层病理变化的影响 在皮层组织中,正常组小鼠大脑皮层中的胶质细胞、神经细胞、微血管形态和数量正常。与正常组比较,模型组神经胶质细胞数量显著增多,神经细胞数量显著减少($P<0.01$)。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组中神经胶质细胞数量有所减少,微血管数量有所增加($P<0.05$),六味地黄丸以高、中剂量组微血管数量增多明显,神经胶质细胞数量减少明显($P<0.05$)。

在海马组织中,正常组小鼠大脑海马组织中胶质细胞、神经细胞数量正常。与正常组比较,模型组神经胶质细胞数量显著增多,神经细胞数量显著减少($P<0.01$);与模型组比较,所有给药组中神经胶

质细胞数量明显减少($P<0.05$)。见图2和图3。

3.3 对AD小鼠脑组织海马和皮层A β 沉积水平的影响 与正常组比较,模型组A β 蛋白表达显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和六味地黄丸高、中、低剂量组A β 蛋白表达明显降低($P<0.05$),以六味地黄丸低剂量组降低最为明显。见表2、图4和图5。

3.4 对AD小鼠脑组织皮层中vWF和CD34表达的影响 与正常组比较,模型组vWF蛋白表达显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和六味地黄丸高、中、低剂量组vWF蛋白表达明显降低($P<0.05$),以六味地黄丸低剂量组降低最为明显。与正常组比较,模型组CD34蛋白表达明显降低($P<$



注:A.正常组;B.模型组;C.盐酸多奈哌齐组;D.六味地黄丸高剂量组;E.六味地黄丸中剂量组;F.六味地黄丸低剂量组(图2-图9同)

图1 各组小鼠Morris水迷宫检测轨迹

Fig. 1 Morris water maze test trajectory of mice in each group

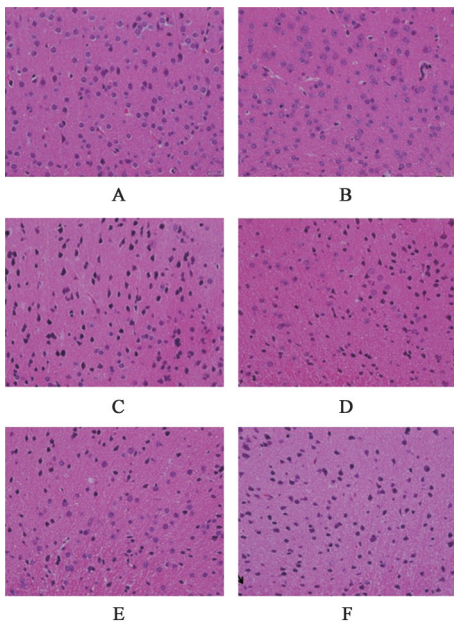


图2 六味地黄丸对AD小鼠脑组织皮层病理变化的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on cerebral cortex in brain tissue of AD mice (HE, ×400)

0.05)。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和六味地黄丸高、中、低剂量组CD34蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。见表3、图6和图7。

3.5 对AD小鼠脑组织超微结构变化的影响 与正常组比较,模型组脑微血管内皮细胞间隙紧密连接

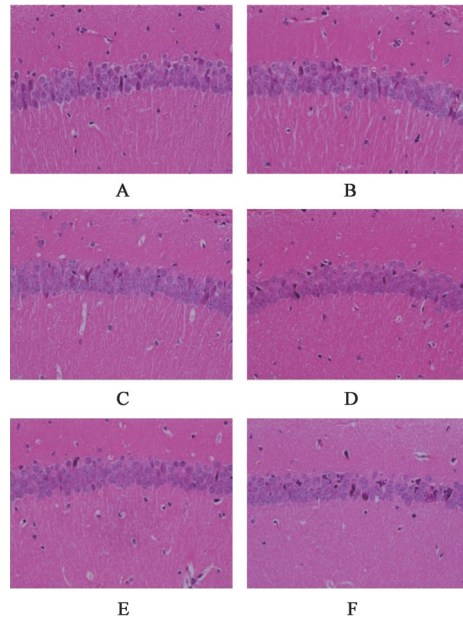


图3 六味地黄丸对AD小鼠脑组织海马病理变化的影响(HE, ×400)

Fig. 3 Effect of Liuwei Dihuangwan on brain tissue hippocampus in brain tissue of AD mice (HE, ×400)

表2 六味地黄丸对AD小鼠脑组织海马和皮层Aβ沉积水平的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on Aβ deposition levels in hippocampal and cortical in brain tissue of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	大脑皮层Aβ	海马Aβ
正常组		85.56±5.28	90.98±0.50
模型组		117.45±1.62 ¹⁾	109.19±0.43 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	100.85±7.73 ²⁾	97.28±2.69 ²⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	108.70±2.55 ²⁾	98.14±8.61 ²⁾
六味地黄丸中剂量组	1.350	104.93±4.54 ²⁾	98.08±1.71 ²⁾
六味地黄丸低剂量组	0.675	76.14±1.33 ²⁾	76.02±2.52 ²⁾

模糊或间隙变大,膜结构损伤较重,内皮细胞线粒体肿胀、膜破裂、嵴大部分溶解。与模型组相比,盐酸多奈哌齐组和六味地黄丸组中脑微血管内皮细胞间隙紧密连接双层膜结构较清晰,内皮细胞中线粒体数量增多、线粒体膜完整、线粒体嵴恢复,基本接近正常组,以盐酸多奈哌齐组六味地黄丸高剂量组恢复最为明显。见图8。

3.6 对AD小鼠脑组织皮层RAGE、LRP1、P-selection和VEGF-A蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑组织皮层中RAGE和P-selection蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),LRP1和VEGF-A蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和六味地黄丸高、中剂

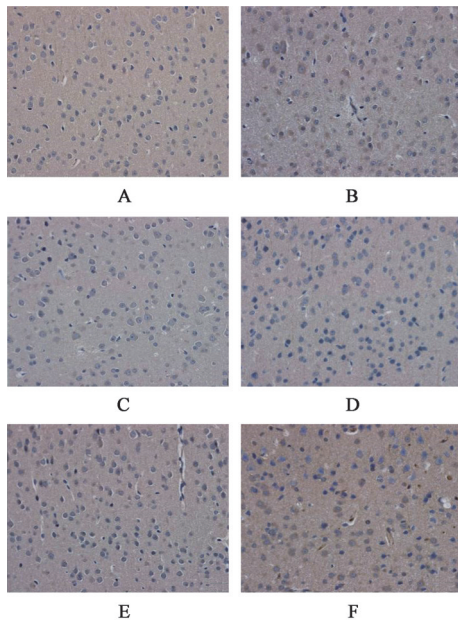


图4 六味地黄丸对AD小鼠脑组织皮层中Aβ蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of Aβ protein in cerebral cortex of AD mice (IHC, ×400)

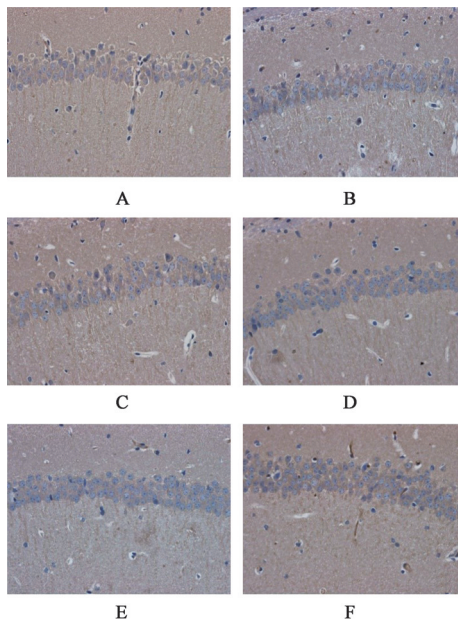


图5 六味地黄丸对AD小鼠脑组织海马中Aβ蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of Aβ protein in hippocampus of AD mice (IHC, ×400)

量组 RAGE 和 P-selection 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 盐酸多奈哌齐组和六味地黄丸高、中剂量组 LRP1 和 VEGF-A 有所升高 ($P < 0.05$)。见表4、图9。

4 讨论

AD是一种严重的老年性神经退行性疾病,会

表3 六味地黄丸对AD小鼠脑组织皮层中vWF和CD34表达的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of vWF and CD34 in cortex of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	vWF	CD34
正常组		33.38±1.13	73.95±7.65
模型组		76.51±6.32 ²⁾	50.73±5.44 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	29.59±4.25 ³⁾	82.06±8.15 ³⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	34.11±2.69 ³⁾	91.54±8.25 ³⁾
六味地黄丸中剂量组	1.350	41.81±10.17 ³⁾	97.57±4.24 ³⁾
六味地黄丸低剂量组	0.675	27.15±2.22 ³⁾	85.14±7.24 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$

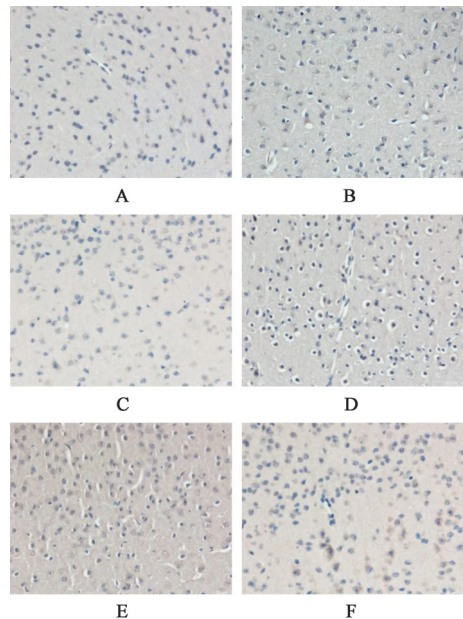


图6 六味地黄丸对AD小鼠脑组织皮层中vWF蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 6 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of vWF protein in cerebral cortex of AD mice (IHC, ×400)

影响认知、行为和功能^[21]。Aβ的沉积是AD的主要典型病理特征之一。SAMP8小鼠是快速老化小鼠品系中的一个亚系,主要以学习、记忆障碍为主要特征是目前公认的自然衰老痴呆模型^[22-24]。在本研究中模型组与SAMR1正常衰老组比较,模型组小鼠Morris水迷宫检测逃避潜伏期延长,海马和皮层中Aβ蛋白表达显著增加,神经元排列紊乱等病理改变,表明模型组小鼠学习记忆能力减退,脑组织中Aβ沉积增多,表现出与AD患者相同的临床症状。

RAGE是血脑屏障(BBB)上将Aβ从血液转运入脑组织的主要受体^[25-27]。BMECs细胞膜上的

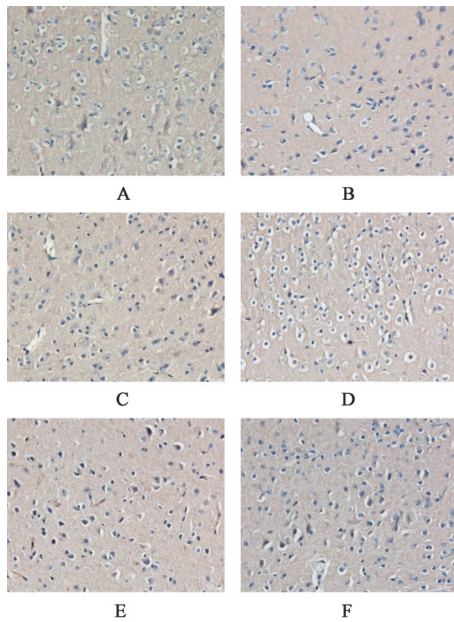


图7 六味地黄丸对AD小鼠脑组织皮层中CD34蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 7 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of CD34 protein in cerebral cortex of AD mice (IHC, ×400)

RAGE与 $A\beta$ 结合后,可促使 $A\beta$ 穿过BBB后在脑内积聚,并激活小胶质细胞,产生氧化应激反应,生成活性氧(ROS),促进凋亡,同时促进炎症因子的表达,引起炎症反应^[28-30]。在一些神经退行性疾病中也证明了RAGE参与病理生理过程^[31]。将配体与RAGE结合后,氧化应激增加,而且,RAGE的过度表达可导致有害循环,使氧化应激持续存在。而LRP1与RAGE的作用相反,主要介导 $A\beta$ 向脑外转

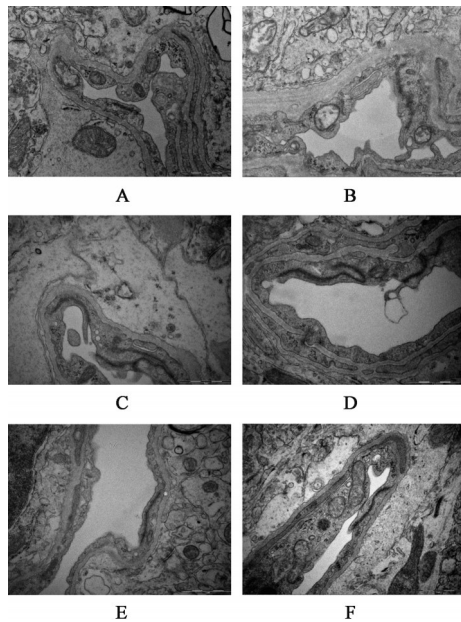


图8 六味地黄丸对AD小鼠脑组织超微结构变化的影响(透射电镜, ×30 000)

Fig. 8 Effect of Liuwei Dihuangwan on ultrastructural changes of hippocampal in brain tissue of AD mice (TEM, ×30 000)

运。LRP1通过与 $A\beta$ 直接结合、或通过LRP1配体与 $A\beta$ 结合后,将脑内 $A\beta$ 转运至血液^[32]。衰老的大脑中 $A\beta$ 的累积主要通过LRP1错误切割 $A\beta$ 和(或)外周的 $A\beta$ 流入脑中的增加,或通过RAGE/ $A\beta$ 相互作用透过BBB方式产生^[33]。研究表明,六味地黄丸能够调节血管内皮生长因子保护 $A\beta$ 对神经元的损伤。因此,在本研究中,研究了六味地黄丸对AD中RAGE/LRP1系统及血管新生的影响。

表4 六味地黄丸对AD小鼠脑组织皮层RAGE、LRP1、P-selection和VEGF-A蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of RAGE, LRP1, P-selection and VEGF-A in brain tissues of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RAGE/GAPDH	LRP1/GAPDH	P-selection/GAPDH	VEGF-A/GAPDH
正常组		0.57±0.02	0.77±0.03	1.40±0.05	0.84±0.02
模型组		0.85±0.09 ¹⁾	0.62±0.02 ¹⁾	1.51±0.02 ¹⁾	0.67±0.04 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	0.67±0.03 ²⁾	1.07±0.04 ²⁾	1.25±0.03 ²⁾	0.88±0.01 ²⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	0.65±0.08 ²⁾	1.16±0.03 ²⁾	0.96±0.03 ²⁾	0.77±0.03 ²⁾
六味地黄丸中剂量组	1.350	0.66±0.02 ²⁾	1.12±0.05 ²⁾	1.07±0.04 ²⁾	0.75±0.03 ²⁾
六味地黄丸低剂量组	0.725	0.85±0.08	1.01±0.06 ²⁾	1.55±0.05	0.58±0.01 ²⁾

六味地黄丸由“三补”药之熟地黄、山药、山茱萸与“三泻”药之泽泻、牡丹皮、茯苓6味组合而成,能滋补肾阴、填精益髓,具有增强免疫力、延缓衰老、抗炎、抗氧化和改善肾功能等功效,对免疫系统及心脑血管系统都有一定的保护作用^[34-35]。本实验研究结果显示,模型组小鼠脑组织中 $A\beta$ 蛋白沉积和RAGE的表达显著增加,LRP1的表达降低;病理

结果显示神经细胞数量减少,肿胀,核偏移,神经胶质细胞数量增多;超微结构表明血管内皮连接间隙增大,血管内皮细胞线粒体肿大、嵴断裂。六味地黄丸作用后神经元和神经胶质细胞数量明显变化,细胞内皮连接间隙变小,部分恢复正常;线粒体结构部分恢复,同时, $A\beta$ 和RAGE的表达水平被下调,增加LRP1的表达。与之一致的研究表明在AD患

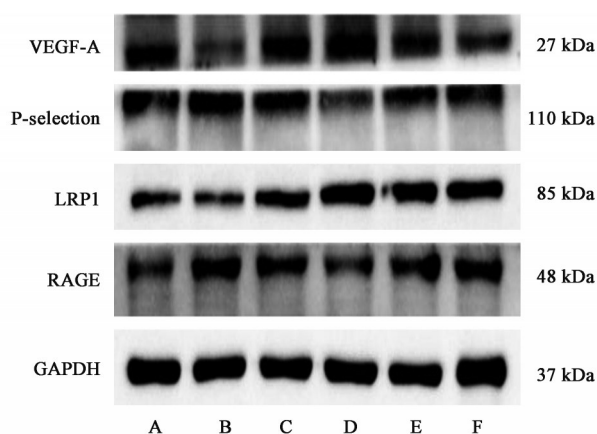


图9 各组小鼠脑组织皮层 RAGE、LRP1、P-selection 和 VEGF-A 蛋白表达电泳

Fig. 9 Electrophoresis of RAGE, LRP1, P-selection and VEGF-A protein expressions in brain tissues of each group

者和小鼠 AD 模型中, RAGE 在神经血管单元中尤其是 $A\beta$ 富集的条件下的表达增多^[36]。RAGE 携带 $A\beta$ 通过血脑屏障大量流入脑内, $A\beta$ 沉积则反过来刺激 RAGE, 使其进一步表达增加, 形成恶性循环^[32]。此外, 神经元和小胶质细胞上的 RAGE 也可与 $A\beta$ 结合, 激活小胶质细胞, 引发 AD 相关病理过程^[37-39]。这些结果提示六味地黄丸能够有效降低 $A\beta$ 毒性引起的神经元损伤, 改善 AD 模型小鼠血管内皮, 这可能通过调节 RAGE/LRP1 系统实现的。

本研究中探讨了六味地黄丸对 AD 模型小鼠中血管内皮相关因子 VEGF-A、P-selection、vWF 和具有血管新生功能 CD34 表达的影响, 研究六味地黄丸对神经-血管单元的作用。结果表明, 六味地黄丸降低了 P-selection 和 vWF 的表达, 增加了 VEGF-A 和 CD34 的表达。VEGF-A 是调节血管内皮细胞功能的主要细胞因子, 能够与内皮细胞表面受体酪氨酸激酶结合促进血管内皮细胞生成并参与血管重建。体外实验中 VEGF-A 与 $A\beta$ 表现出高亲和力, 并不断沉积在 $A\beta$ 斑块周围, 形成紧密结合复合物, VEGF-A 释放非常缓慢, 最终导致局部 VEGF-A 缺乏, 失去神经保护功能及血管修复功能^[40-41]。P-selection 是凝血酶活化的血小板和血管内皮细胞上的白细胞黏附受体, 通常储存在内皮细胞的小体和血小板中, 在受到炎症、缺血、缺氧刺激时, 选择素可迅速在内皮细胞的质膜上表达^[42]。CD34 能够黏附、促血管前内皮细胞聚集并形成血管、调控造血细胞增殖和分化^[43]。vWF 在调节血小板黏附于受损内皮过程中起关键作用, 与内皮受损程度成正比, 是内皮受损的一个敏感分子标志物^[44]。三者的表达水平直接影响血管内膜的修复、脑微血管新生

等功能。研究表明 $A\beta$ 与 RAGE 相互作用促使血管内皮损伤, 增加血管黏附因子 P-selection 和内皮损伤因子 vWF 的表达, 减少 VEGF-A 和 CD34 的表达。而六味地黄丸作用能够逆转这一现象。

综上所述, 研究表明, 快速老化 SAMP8 小鼠中 RAGE/LRP1 蛋白表达紊乱, $A\beta$ 、P-selection 和血管内皮损伤因子 vWF 过度表达, 而 VEGF-A 和 CD34 表达下降。六味地黄丸改善了 AD 模型小鼠脑部病理的形态变化, 减轻 AD 症状。推断六味地黄丸改善脑微血管损伤的作用可能是通过神经-血管单元 RAGE/LRP1 受体系统对 AD 模型小鼠脑微血管相关因子产生调节作用, 这为六味地黄丸防治 AD 提供了一种新的思路和药物作用的新靶点及可靠的实验证据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 李凌杰, 于晓琳, 刘瑞田. 胶质细胞介导的神经突触修剪在阿尔茨海默病中的作用[J]. 药学报, 2021, 56(2):383-390.
- [2] WANG P, SUI H J, LI X J, et al. Melatonin ameliorates microvessel abnormalities in the cerebral cortex and hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(4):787-794.
- [3] 世界中医药学会联合会, 中华中医药学会. 国际中医临床实践指南—阿尔茨海默病(2019-10-11)[J]. 世界中医药, 2021, 16(8):1181-1187.
- [4] MARTINEZ B, PELOW P V. Amelioration of Alzheimer's disease pathology and cognitive deficits by immunomodulatory agents in animal models of Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(7):1158-1176.
- [5] SCHEFFER S, HERMKENS D, VAN DER WEERD L, et al. Vascular hypothesis of alzheimer disease: Topical review of mouse models [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(4):1265-1283.
- [6] JU Y, TAM K Y. Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease [J]. Neural Regen Res, 2022, 17(3):543-549.
- [7] SUN B L, CHEN Y, FAN D Y, et al. Critical thinking on amyloid-beta-targeted therapy: Challenges and perspectives [J]. Sci China Life Sci, 2021, 64(6):926-937.
- [8] 杜娟, 黄昶荃, 何馥倩. β 淀粉样蛋白清除的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(2):411-415.
- [9] 张君臣, 徐武华. LRP1 调控 $A\beta$ 代谢的机制及其对 AD 防治研究的启示 [J]. 中华神经医学杂志, 2019,

- 18(12):1289-1293.
- [10] CAI Z, LIU N, WANG C, et al. Role of RAGE in Alzheimer's disease[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36: 483-495.
- [11] WAN W, CHEN H, LI Y. The potential mechanisms of A β -receptor for advanced glycation end-products interaction disrupting tight junctions of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease[J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(2):75-81.
- [12] KVARTSBERG H, DUIJS F H, INGELSSON M, et al. Cerebrospinal fluid levels of the synaptic protein neurogranin correlates with cognitive decline in prodromal Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(10):1180-1190.
- [13] AGRAWAL S, ABUD E M, SNIGDHA S, et al. IgM response against amyloid-beta in aging: A potential peripheral protective mechanism [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2018, 10(1):81.
- [14] FLEMMIG J, ZÁMOCKÝ M, ALIA A. Amyloid β and free heme: Bloody new insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(7):1170-1174.
- [15] FULOP T, WITKOWSKI J M, BOURGADE K, et al. Can an infection hypothesis explain the beta amyloid hypothesis of alzheimer's disease? [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10:224.
- [16] MANTLE J L, LEE K H. A differentiating neural stem cell-derived astrocytic population mitigates the inflammatory effects of TNF- α and IL-6 in an iPSC-based blood-brain barrier model [J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 119:113-120.
- [17] OH S, SON M, CHOI J, et al. sRAGE prolonged stem cell survival and suppressed RAGE-related inflammatory cell and T lymphocyte accumulations in an Alzheimer's disease model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1):807-813.
- [18] LO E H, DALKARA T, MOSKOWITZ M A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(5):399-415.
- [19] 宋军营, 袁永, 王丛笑, 等. 六味地黄丸含药血清对 β -淀粉样蛋白损伤大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞的保护作用研究[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(30):3763-3769.
- [20] 韩诚, 张俊龙. 从“肾脑相关”论衰老学习记忆功能障碍[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(10):5112-5116.
- [21] HU Q, YU B, CHEN Q, et al. Effect of Linguizhugan decoction on neuroinflammation and expression disorder of the amyloid β -related transporters RAGE and LRP-1 in a rat model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):827-834.
- [22] GRINÁN-FERRÉ C, CORPAS R, PUIGORIOL-ILLAMOLA D, et al. Understanding epigenetics in the neurodegeneration of Alzheimer's disease: SAMP8 mouse model [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(3):943-963.
- [23] 普元柱, 苏灿. 灯盏细辛及其活性成分防治阿尔茨海默病的药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(23):5650-5657.
- [24] 赵玉晓, 戈利生, 赵丽莉, 等. 电针联合音乐疗法对轻中度阿尔茨海默病患者认知功能和日常生活活动能力的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(13):1998-2001.
- [25] 高爱社, 杨洒, 张振强, 等. 丹菱片对A β_{1-40} 致脑微血管内皮细胞损伤保护作用的机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(2):234-239.
- [26] 潘晓东, 陈晓春. 非酶糖化、晚期糖基化终产物与阿尔茨海默病[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2005, 32(4):334-337.
- [27] 张丁阳, 解紫从, 华茜. 补肾益智方药治疗阿尔茨海默病疗效的系统评价与Meta分析[J]. *世界中医药*, 2021, 16(13):1990-1997.
- [28] 丛潇, 王友政, 张文生. 晚期糖基化终末产物受体与阿尔茨海默病[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(12):1759-1761.
- [29] LI Y, ZHOU S, LI J, et al. Quercetin protects human brain microvascular endothelial cells from fibrillar β -amyloid1-40-induced toxicity[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1):47-54.
- [30] 张誉丹, 毛剑琴, 袁林, 等. 固本健脑液对阿尔兹海默症大鼠生物钟基因 Clock、Bmal1 及海马 A β 的影响 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(23):3634-3638, 3645.
- [31] TóBON-VELASCO J C, CUEVAS E, TORRES-RAMOS M A. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF- κ B pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014, 13(9):1615-1626.
- [32] GOVINDPANI K, VINNAKOTA C, WALDVOGEL H J, et al. Vascular dysfunction in Alzheimer's disease: A biomarker of disease progression and a potential therapeutic target [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(6):1030-1032.
- [33] KONG C, XIE H, GAO Z, et al. Binding between prion protein and A β oligomers contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Virol Sin*, 2019, 34(5):475-488.
- [34] 罗虹, 刘博文, 杨慧, 等. 基于网络药理学及活性成分测定的六味地黄系列制剂质量研究[J]. *中草药*,

- 2020, 51(21): 5462-5477.
- [35] 王铷, 贾亚泉, 宋军营, 等. 基于网络药理学的六味地黄汤治疗痴呆机制研究[J]. 河南大学学报: 医学版, 2021, 40(2): 84-92.
- [36] FREYSSIN A, PAGE G, FAUCONNEAU B, et al. Natural stilbenes effects in animal models of Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(5): 843-849.
- [37] SUDHAKAR V, RICHARDSON R M. Gene therapy for neurodegenerative diseases [J]. *Neurotherapeutics*, 2019, 16(1): 166-175.
- [38] 林华伟, 柳维林, 王志福, 等. 小胶质细胞膜受体在阿尔茨海默病中的作用 [J]. 中国康复理论与实践, 2020, 26(1): 62-66.
- [39] 董一峰, 狄婷婷, 徐树雷, 等. 不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 对小胶质细胞上 RAGE/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(14): 3501-3505.
- [40] YANG S P, BAE D G, KANG H J, et al. Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(3): 283-290.
- [41] 王丛笑, 宋军营, 张振强. VEGF 在阿尔茨海默病中相关作用机制的研究 [J]. 中医学报, 2015(1): 109-113.
- [42] 岳孟孟, 李雪莹, 赵迎春, 等. P-选择素及 P-选择素糖蛋白配体-1 基因多态性与缺血性脑血管病关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(24): 4919-4923.
- [43] 杨婷, 张莉君, 黄睿, 等. 中药活性成分调控血管新生的研究进展 [J]. 药学报, 2020, 55(9): 1995-2007.
- [44] 张语澎, 王欢, 薛文池, 等. 氧化应激-炎症-血栓之恶性交互网络研究新进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(9): 983-994.

[责任编辑 周冰冰]