

· 药理 ·

## 补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠学习记忆 及海马 $\beta$ 淀粉样前体蛋白的影响

费洪新<sup>1,2</sup>, 周忠光<sup>1\*</sup>, 姜波<sup>1</sup>, 杜徽<sup>1</sup>, 韩玉生<sup>1</sup>, 张英博<sup>1,2</sup>, 李宝龙<sup>1</sup>, 朴成玉<sup>1</sup>, 仲丽丽<sup>1</sup>, 白云<sup>1</sup>

(1. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040;

2. 齐齐哈尔医学院基础医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** 目的: 探讨补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力及海马  $\beta$  淀粉样前体蛋白 (APP) 的影响。方法: APP/PS1 双转基因小鼠随机分成对照组、模型组、治疗组 (吡拉西坦  $0.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、补阳还五汤高剂量组 ( $37.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、补阳还五汤中剂量组 ( $18.53 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、补阳还五汤低剂量组 ( $9.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。给予补阳还五汤 *ig*, 连续治疗 28 d 后取材。采用 Morris 水迷宫测试行为学指标, 采用双抗体夹心法测定海马组织 APP 蛋白水平。结果: 与对照组比较, 模型组小鼠逃避潜伏期延长 ( $P < 0.05$ ), 游泳距离增加 ( $P < 0.05$ ), APP 水平增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 补阳还五汤能改善模型小鼠的学习和记忆 ( $P < 0.05$ ), 并且降低海马 APP 水平 ( $P < 0.05$ )。结论: 补阳还五汤能改善模型小鼠的学习记忆功能, 能够通过抑制 APP 蛋白在阿尔茨海默病治疗中发挥重要的作用。

**[关键词]** 补阳还五汤; 阿尔茨海默病; 学习记忆能力;  $\beta$  淀粉样前体蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0125-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200125

## Effects of Buyang Huanwu Decoction on Learning and Memory Ability and Amyloid Precursor Protein of Hippocampal in Alzheimer's Disease Mouse

FEI Hong-xin<sup>1,2</sup>, ZHOU Zhong-guang<sup>1\*</sup>, JIANG Bo<sup>1</sup>, DU Hui<sup>1</sup>, HAN Yu-sheng<sup>1</sup>, ZHANG Ying-bo<sup>1,2</sup>,  
LI Bao-long<sup>1</sup>, PIAO Cheng-yu<sup>1</sup>, ZHONG Li-li<sup>1</sup>, BAI Yun<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Traditional Chinese Medicine of Heilongjiang University  
of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Basic Medical College, Qiqihar Medical University, Qiqihaer 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) on learning and memory ability and amyloid precursor protein (APP) of Hippocampal in Alzheimer's disease mouse. **Method:** APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into control group, model group, treatment group (Piracetam  $0.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), BYHWD high-dose group ( $37.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), BYHWD medial-dose group ( $18.53 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), BYHWD low-dose group ( $9.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). The mice were killed after 28 days continuous administration. The Morris water maze was used to observe the learning and memory ability for the mouse. Biochemical methods were used to determine the content of APP protein in the hippocampal tissue. **Result:** Compared with the control group, model group latencies and swimming distances significantly prolonged ( $P <$

**[收稿日期]** 20140613(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373777,81173599)

**[第一作者]** 费洪新, 在读博士, 讲师, 从事老年性痴呆、痛风、肿瘤研究工作, Tel: 0451-87266828, E-mail: feihongxin2008@163.com

**[通讯作者]** \*周忠光, 博士, 教授, 博士研究生导师, 从事老年性痴呆、痛风、肿瘤研究工作, Tel: 0451-87266828, E-mail: zhouzhongguang5901@163.com

0.05), APP significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, BYHWD could significantly improve the learning and memory ability of model mouse ( $P < 0.05$ ). BYHWD could decrease the content of APP significantly in the hippocampal ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** BYHWD could improve the ability of learning and memory of model mouse. BYHWD plays a certain role in the treatment of Alzheimer's disease through inhibiting APP.

[**Key words**] Buyang Huanwu decoction; Alzheimer's disease; learning and memory ability; amyloid precursor protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种临床上常见的神经退行性疾病之一, 表现为患者记忆能力的减退, 认知能力的下降。随着人口老龄化的出现, AD 的发病率在逐渐增加, 因此此病的治疗是目前热点之一。AD 的发病机制非常复杂, 其中  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid beta protein, A $\beta$ ) 及其 A $\beta$  前体蛋白受到了广泛的关注<sup>[1]</sup>。研究表明补阳还五汤 (Buyang Huanwu decoction, BYHWD) 具有补气、补血、通络等功效<sup>[2]</sup>。BYHWD 具有广泛的生物学作用, 例如改善血液流变学<sup>[3]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[4]</sup>等。本课题组的研究成果显示 BYHWD 提高大鼠血清胰岛素水平<sup>[5]</sup>、降低大鼠  $\beta$  淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 表达<sup>[6]</sup>、降低细胞因子水平<sup>[7]</sup>、BYHWD 增强免疫功能<sup>[8]</sup>等。另外 BYHWD 对 AD 的新模型 APP/PS1 双转基因小鼠的研究尚属空白。基于这些本实验施加 BYHWD 为处理因素, 观察 BYHWD 对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆、APP 水平的影响, 以期为 BYHWD 防治 AD 提供坚实理论依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** Morris 水迷宫 (安徽淮北正华生物仪器设备有限公司), 电子天平 (沈阳龙腾电子称量仪器有限公司)。

**1.2 药品和试剂** BYHWD (组分包括生黄芪 120 g, 当归尾 6 g, 赤芍 4.5 g, 川芎 3 g, 地龙 3 g, 桃仁 3 g, 红花 3 g, 由黑龙江中医药大学田明教授制备成水煎剂); 吡拉西坦 (湖南迪诺制药有限公司, 批号 130325); APP 酶联免疫试剂盒, 批号 20140401, 南京建成生物工程研究所生产; 其他试剂为国产分析纯。

**1.3 动物** 雄性 7 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠 [B6. Cg-Tg (APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup>) 85Dbo/Mmjax], 清洁级、体重 (23  $\pm$  2) g, 由哈尔滨医科大学解剖教研室吴树亮教授赠送; 对照组小鼠, 雄性 C57 小鼠、SPF 级、体重 (23  $\pm$  2) g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001。

## 2 方法

**2.1 APP/PS1 双转基因小鼠的基因鉴定** 设计 PS1 (608 bp) 引物序列 (5'-CAGGTGCTAT AAGGTCAT-3', 5'-ATCACAGCCAAGATGAGC-3'), 按照 Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit 说明书进行, 观察琼脂糖电泳的扩增条带, 筛选出表达 PS1 基因的 AD 模型小鼠。

**2.2 APP/PS1 双转基因小鼠的分组及其给药** APP/PS1 双转基因小鼠共 30 只, 随机分 5 组 ( $n = 6$ ): 模型组 (生理盐水) *ig*, 治疗组 (吡拉西坦 0.62 g·kg<sup>-1</sup>) *ig*, BYHWD 高剂量组 (BYHWD 37.06 g·kg<sup>-1</sup>) *ig*, 中剂量组 (BYHWD 18.53 g·kg<sup>-1</sup>) *ig*, 低剂量组 (BYHWD 9.26 g·kg<sup>-1</sup>) *ig*; 另取 C57 小鼠为对照组 6 只 (生理盐水) *ig*, 共给药 28 d。

**2.3 对 APP/PS1 双转基因小鼠定位航行能力的影响** 小鼠末次给药 1 h 后, 采用 Morris 水迷宫进行测试。Morris 水迷宫水深 20 cm, 高于平台 1 cm, 水温控制在 (23  $\pm$  2) °C。平台放于第四象限, 第 1, 2, 3, 4 天时间为训练时间, 第 5 天为测试时间。每次训练时间为 60 s, 若 60 s 内未找到平台, 则将小鼠引至平台停留 20 s, 此时逃避潜伏期记为 60 s。小鼠每次训练后都要在平台上停留 20 s, 观察小鼠到达平台位置的时间, 就是检测定位航行能力的逃避潜伏期时间。

**2.4 对 APP/PS1 双转基因小鼠空间探索能力的影响** 过程同 2.3, 在测试第 5 天的时候撤去平台, 检测在 60 s 内小鼠找到平台的游泳距离作为衡量小鼠的空间探索能力。

**2.5 对 APP/PS1 双转基因小鼠游泳轨迹的影响** 过程同 2.3, 游泳轨迹一般分为边缘型、趋化型、直线型 3 种, 以此显示小鼠的空间学习记忆综合能力。

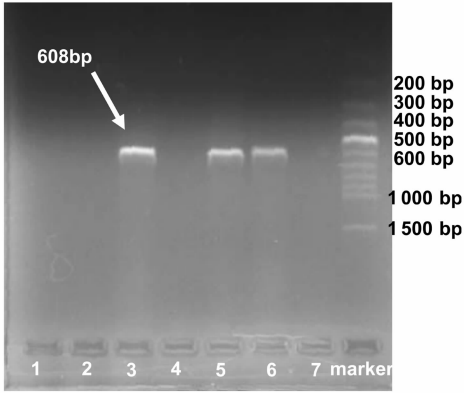
**2.6 对 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织 APP 的影响** 小鼠断头迅速取海马组织、匀浆、静置、离心、分装、低温保存备用、按试剂盒方法 450 nm 波长处测定海马组织 APP 的含量。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件分析, 实验

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析实验的数据。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 APP/PS1 双转基因小鼠基因的鉴定** 1,2,4,7 样本无 PS1 基因,3,5,6 样本有 PS1 基因,确定 3,5,6 样本是 APP/PS1 双转基因小鼠。见图 1。



3,5,6 是 APP/PS1 双转基因小鼠

图 1 APP/PS1 双转基因小鼠基因鉴定(PCR 法,×200)

**3.2 对 APP/PS1 双转基因小鼠定位航行能力和空间探索能力的影响** 与对照组逃避潜伏期比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显增加( $P < 0.05$ );与模型组逃避潜伏期比较,吡拉西坦治疗组、BYHWD 高、中剂量组小鼠逃避潜伏期明显缩短( $P < 0.05$ )。与对照组游泳距离比较,模型组小鼠游泳距离明显增加( $P < 0.05$ );与模型组游泳距离比较,吡拉西坦治疗组、BYHWD 高、中剂量组小鼠游泳距离明显缩短( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 BYHWD 对 APP/PS1 双转基因定位航行能力和空间探索能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	定位航行能力 逃避潜伏期/s	空间探索能力 游泳距离/cm
对照	-	18 ± 11	700 ± 248
模型	-	44 ± 12 <sup>1)</sup>	1 292 ± 147 <sup>1)</sup>
吡拉西坦	0.62	21 ± 10 <sup>2)</sup>	775 ± 162 <sup>2)</sup>
BYHWD	37.06	30 ± 14 <sup>2)</sup>	837 ± 138 <sup>2)</sup>
	18.53	25 ± 8 <sup>2)</sup>	781 ± 99 <sup>2)</sup>
	9.26	40 ± 12	1 148 ± 85

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

**3.3 对 APP/PS1 双转基因小鼠游泳轨迹的影响** 模型组、BYHWD 低剂量组小鼠的游泳轨迹多为边缘型;对照组、吡拉西坦治疗组、BYHWD 高、中剂量

组小鼠的游泳轨迹多为直线型和趋化型。

**3.4 对 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织 APP 的影响** 与对照组 APP 含量比较,模型组小鼠 APP 含量明显升高( $P < 0.05$ );与模型组 APP 含量比较,吡拉西坦治疗组、BYHWD 高、中剂量组小鼠 APP 含量明显降低( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 BYHWD 对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 APP 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	海马 APP/ng·L <sup>-1</sup>
对照	-	400 ± 95
模型	-	515 ± 70 <sup>1)</sup>
吡拉西坦	0.62	427 ± 52 <sup>2)</sup>
BYHWD	37.06	438 ± 38 <sup>2)</sup>
	18.53	435 ± 62 <sup>2)</sup>
	9.26	489 ± 57

### 4 讨论

AD 表现为记忆能力和学习能力的减退,αβ 和 APP 含量明显增多,因此探寻 AD 小鼠学习、记忆能力尤为重要。近年来很多研究者采用 APP/PS1 双转基因小鼠来开展实验研究<sup>[9]</sup>。另外应用补气黄芪治疗 AD 的相关文章有 1 794 篇,应用补血当归治疗 AD 的相关文章有 981 篇,而 BYHWD 有补气、补血的功效。基于这些研究 BYHWD 对 APP/PS1 双转基因小鼠海马学习和记忆的影响,同时检测 APP 蛋白水平。

实验结束后水迷宫数据显示,模型组小鼠逃避潜伏期和游泳距离明显增加,说明模型建立成功,模型小鼠的学习能力、记忆能力很差;BYHWD 高、中剂量组小鼠逃避潜伏期和游泳距离明显缩短,说明 BYHWD 高、中剂量对 APP/PS1 双转基因小鼠的治疗有明显效果,可以改善小鼠的学习、记忆。以上综合提示在临床的治疗中,应该选择 BYHWD 高、中剂量针对 AD 的治疗。

实验结束后游泳轨迹显示,模型组、BYHWD 低剂量组小鼠的游泳轨迹多为边缘型,说明低剂量的 BYHWD 改善 APP/PS1 双转基因小鼠空间学习记忆能力不明显;BYHWD 高、中剂量组小鼠的游泳轨迹多为直线型和趋化型,说明高剂量、中剂量的 BYHWD 可以提高 APP/PS1 双转基因小鼠的空间学习记忆能力,并且 BYHWD 中剂量与吡拉西坦的图形接近,说明中剂量的 BYHWD 改善 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力较好,因此结合游泳轨迹的图谱建议在临床的治疗中采用 BYHWD 中剂量进行治疗。

# 基于基线等比增减设计法优选葛根-黄连抗消渴最佳配比

王霜<sup>1</sup>, 赵兴冉<sup>1</sup>, 南星梅<sup>1</sup>, 谭睿<sup>2</sup>, 顾健<sup>1\*</sup>

(1. 西南民族大学民族医药研究院, 成都 610041;

2. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

**【摘要】** 目的: 通过不同配比葛根-黄连(葛-黄)对不同模型糖尿病小鼠血糖影响, 对链尿佐菌素(STZ)复合高脂饲料喂养致糖尿病小鼠模型血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)含量的影响, 探索葛根-黄连伍用抗消渴的最佳配比方案。方法: 雄性 SPF 级小鼠, 对正常小鼠血糖影响实验随机分为空白组、二甲双胍组(0.5 g·kg<sup>-1</sup>)、葛-黄 0:10, 8:3, 6:5, 3:8, 10:0 组(4 g·kg<sup>-1</sup>); 对四氧嘧啶和 STZ 所致糖尿病小鼠实验, 造模 72 h 后尾尖取血测定小鼠空腹血糖(FBG), 成模小鼠随机分为空白组、模型组、二甲双胍组、葛-黄 10:0, 8:3, 6:5, 3:8, 0:10 组, 给药后 7, 14 d 分别观察不同配比葛-黄对正常小鼠及四氧嘧啶致糖尿病小鼠 FBG 的影响, 对 STZ 复合高脂饲料致糖尿病小鼠 FBG, TC, TG 的影响。结果: 葛-黄 10:0, 8:3, 6:5, 3:8, 0:10 这 5 组均能明显降低四氧嘧啶致高血糖小鼠模型和 STZ 复合高脂饲料喂养致糖尿病小鼠模型空腹血糖, 降低 STZ 复合高脂饲料致糖尿病小鼠模型血清 TG, TC 含量, 同时降低正常小鼠空腹血糖, 其中降糖、降低 TG, TC 效果葛-黄 3:8 组疗效突出( $P < 0.01$ ), 黄连单味药次之。结论: 葛根、黄连单用及伍用抗消渴疗效确切, 能明显改善糖尿病相关生化指标, 伍用药效优于单味药且存在最佳配比。

**【关键词】** 葛根; 黄连; 伍用; 空腹血糖

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2014)20-0128-04

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200128

**【收稿日期】** 20140508(014)

**【基金项目】** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09103-002-014); 成都市科技局项目(11DXYB263JH-027); 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2014SZ64)

**【第一作者】** 王霜, 硕士研究生, 从事民族药物及中药的研究开发, Tel:18683939133, E-mail:cindywangkx1108@sina.com

**【通讯作者】** \* 顾健, 博士, 教授, 博士生导师, 从事民族药物及中药的研究开发, Tel:028-85523968, E-mail:gujianed@163.com

实验中测定 APP 的指标中可见, 与对照组比较, 模型组小鼠海马组织 APP 含量明显增加( $P < 0.05$ ), 说明模型组 APP 含量多; 与模型组比较, BYHWD 高、中剂量组小鼠海马组织 APP 含量明显降低( $P < 0.05$ ), 说明 BYHWD 高、中剂量对小鼠海马组织 APP 影响明显。提示采用 BYHWD 高、中剂量治疗 AD 效果好, 也说明 AD 的发病与 APP 相关, BYHWD 可以通过抑制 APP 来达到治疗 AD 的目的。

综上所述, BYHWD 可以改善 APP/PS1 双转基因小鼠学习、记忆能力, 降低 APP 的水平, 减轻 AD 的症状, 提示 BYHWD 可通过降低 APP 的水平改善小鼠的行为学指标, 具体机制还有待于进一步研究。

## 【参考文献】

- [1] 孙博, 费洪新, 姜波, 等. 阿尔茨海默病发病机制初探[J]. 中医药信息, 2014, 31(3): 26.
- [2] 刘俊娥, 张继平. 补阳还五汤药效物质基础的研究进展[J]. 中医药信息, 2012, 29(5): 117.
- [3] 王晚霞, 李荣亨. 补阳还五汤作用机制研究进展[J].

中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(5): 574.

- [4] 邱顺辉, 章常华, 高书亮, 等. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化与间隙连接蛋白关系的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 161.
- [5] 韩雪燕, 李宝龙, 刘旭, 等. 补阳还五汤对 AD 大鼠血清中胰岛素含量影响的实验研究[J]. 中医药信息, 2010, 27(1): 93.
- [6] 韩玉生, 周忠光. 补阳还五汤对  $A\beta_{1-40}$  所致老年性痴呆大鼠海马区  $\beta$  淀粉样前体蛋白及相关基因表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 9.
- [7] 周忠光, 韩玉生, 姜波, 等. 补阳还五汤及拆方对  $A\beta_{1-40}$  所致 AD 大鼠血清与海马组织  $A\beta$  和细胞因子含量的影响[J]. 山西医药杂志, 2008, 37(2): 129.
- [8] 刘旭, 李宝龙, 周忠光, 等. 补阳还五汤胶囊对  $A\beta_{1-40}$  所致 AD 大鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 中医药信息, 2012, 29(2): 36.
- [9] 周妍妍, 刘艳丽, 董春雪, 等. 五味子醇甲对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠脑组织突触素、 $\alpha$  突触核蛋白表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1076.

【责任编辑】 聂淑琴