

补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠海马形态学 和 β 淀粉样蛋白水平的影响

费洪新^{1,2}, 韩玉生¹, 杜徽¹, 仲丽丽¹, 李宝龙¹, 朴成玉¹,
张英博^{1,2}, 廖婷¹, 白云¹, 姜波¹, 周忠光^{1*}

(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:**研究补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠海马形态学、脑和脾脏脏器指数、 β 淀粉样蛋白($A\beta$)水平的影响。**方法:**雄性 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组、阳性药吡拉西坦 $0.62 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、补阳还五汤高、中、低剂量组 ($37.06, 18.53, 9.26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。以同遗传背景的 C57 小鼠为正常对照组。ig 给予补阳还五汤, 连续治疗 28 d 后取材, 观察小鼠海马镜下形态结构、脑和脾脏脏器指数, 采用双抗体夹心法测定海马组织 $A\beta$ 水平。**结果:**与 C57 对照组比较, 模型组小鼠神经元数量减少、发生变性, 脑和脾脏的脏器指数明显降低 ($P < 0.05$), $A\beta$ 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤组海马神经元细胞形态改善明显, 脑和脾脏脏器指数明显升高 ($P < 0.05$), $A\beta$ 水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:**补阳还五汤能维持阿尔茨海默病小鼠神经元的正常形态结构, 升高脑和脾脏脏器指数, 降低 $A\beta$ 水平。

[关键词] 补阳还五汤; 阿尔茨海默病; 形态学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0142-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230142

Effects of Buyang Huanwu Tang on Morphology and β -amyloid of Hippocampal in Alzheimer's Disease Mice

FEI Hong-xin^{1,2}, HAN Yu-sheng¹, DU Hui¹, ZHONG Li-li¹, LI Bao-long¹, PIAO Cheng-yu¹,
ZHANG Ying-bo^{1,2}, LIAO Ting¹, BAI Yun¹, JIANG Bo¹, ZHOU Zhong-guang^{1*}

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

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

[Abstract] **Objective:** To study effects of Buyang Huanwu Tang (BYHWT) on morphology and organ coefficients of splenic organ and brain and β -amyloid ($A\beta$) of hippocampal in Alzheimer's disease mice. **Method:** Male APP/PSI double transgenic mice were randomly divided into control group, model group, treatment group, BYHWT high-dose group ($37.06 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium dose group ($18.53 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), low-dose group ($9.26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The mice were killed 28 days after continuous treating. After the treatment all animals were sacrificed, morphology of Hippocampal was observed, calculated the organ coefficients of splenic organ and brain. Biochemical methods were used to determine the content of $A\beta$ in the hippocampal tissue. **Result:** Compared with the control group, the model group had no normal morphological structure of nerve cells and the number of nerve cells was significantly decreased, the organ coefficients of splenic organ and brain significantly decreased ($P <$

[收稿日期] 20140606(003)

[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:13514641639, E-mail: feihongxin2008@163.com

[通讯作者] *周忠光, 博士, 教授, 博士生导师, 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), $A\beta$ was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the BYHWT group recovered normal morphological structure of nerve cells and the number of nerve cells was significantly increased, the organ coefficients of splenic organ and brain significantly increased ($P < 0.05$), $A\beta$ was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** BYHWT can improve normal morphological structure of nerve cells of Alzheimer's disease mice, increase organ coefficients of splenic organ and brain and decrease $A\beta$ responses.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; Alzheimer's disease; morphology

随着全世界老龄化的到来,如何治疗老年性疾病已经成为研究的热门方向。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是临床上患者常见的老年性、多发性、退行性、神经性疾病之一,主要表现是机体脑组织海马部位出现淀粉样斑块的沉积,淀粉样斑块的核成分是 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)^[1]。关于AD的治疗临床上多采用西药来治疗,如胆碱酯酶抑制剂、抗氧化剂、抗炎药物等,但是西药有明显的副作用,因此研究中药及其复方制剂是目前迫切要解决的任务。祖国医学的方剂补阳还五汤(Buyang Huanwu Tang, BYHWT)具有广泛的生物学作用,如抗脑缺血^[2]等。BYHWT的主要药物包括生黄芪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,其有效成分主要是黄芪甲苷、阿魏酸、芍药苷、红花黄色素、川芎嗪等^[3]。本实验采用APP/PS1双转基因AD小鼠模型为研究对象,观察BYHWT对AD小鼠脑组织海马形态学、脏器指数和 $A\beta$ 水平的影响,以期为临床治疗AD奠定基础。

1 材料

1.1 动物 雄性7月龄清洁级APP/PS1双转基因小鼠,体重(23±2)g,由哈尔滨医科大学解剖教研室吴树亮教授赠送。另外做对照的小鼠是同月龄、同背景C57小鼠,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)2012-0001。

1.2 药物与仪器 吡拉西坦(湖南迪诺制药有限公司,批号130325), $A\beta$ 酶联免疫试剂盒(批号20140401,南京建成生物工程研究所),BYHWT购于黑龙江中医药大学第一附属医院,由黑龙江中医药大学实验中心研究室田明教授制备,其他试剂均为国产分析纯。Leica-2135切片机(德国Leica公司),TGL-16G台式离心机(上海安亭科学仪器厂),PLZOZ-S型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)等。

2 方法

2.1 动物基因的鉴定 APP/PS1双转基因传代小鼠鼠尾剪断0.5 cm,提取基因组DNA,设计PS1

(608 bp)引物序列(5'-CAGGTGCTATAAGGTCAT-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模型小鼠进行下面的实验。

2.2 动物分组 确定为AD的小鼠共60只,分为5组,其中模型组、阳性药组、BYHWT高、中、低剂量组,每组各12只,另设立同月龄、同背景的C57小鼠12只为正常对照组。

2.3 动物的一般状态观察 小鼠的一般状态观察包括摄取食物、饮用水、体重指数、动物毛发、动物色泽、动物活动度、毛发光泽度、动物粪便颜色、动物垫料的潮湿度等指标。

2.4 动物给药 动物经过1周的实验室饲养适应期后,生长状态良好,确定开始小鼠给药。每天上午8:30对照组小鼠12只,给予生理盐水ig 0.4 mL;模型组12只,给予生理盐水ig 0.4 mL;阳性药组12只,给予吡拉西坦(0.62 g·kg⁻¹)ig 0.4 mL;补阳还五汤高、中、低剂量组给予37.06, 18.53, 9.26 g·kg⁻¹ ig 0.4 mL,连续给药28 d。

2.5 动物脏器指数的测定 小鼠断头处死,冰上迅速解剖,取材小鼠脑、脾脏,用生理盐水将脏器清洗干净,洗去残余的血液,采用电子天平精确称取小鼠的脏器质量,计算脏器指数。

小鼠脏器指数 = 小鼠脏器质量(mg)/小鼠体重(g)

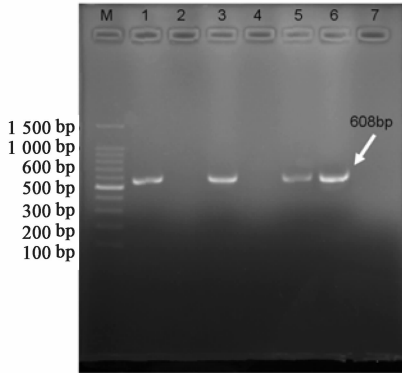
2.6 动物海马标本制备 小鼠乙醚麻醉,剪开腹腔、胸腔,暴露心脏,剪开右心耳,针头插入左心室,缓慢匀速对小鼠灌注50 mL生理盐水,肝脏变白后,改换成4%多聚甲醛,缓慢匀速灌注固定50 mL,断头取脑组织固定,按照常规方法做成石蜡切片。切片脱蜡,苏木精染色,分化,氨水处理,伊红染色,乙醇脱水,透明,干燥,封片,显微镜观察海马组织CA₁, CA₃区结构。

2.7 动物海马 $A\beta$ 的检测 小鼠断头迅速取海马组织,匀浆,4℃静置1 h,4℃离心机3 000 r·min⁻¹ 20 min,分装,-20℃低温保存备用。按说明书进行操作,450 nm波长处测定各孔吸光度(A)。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件分析处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析数据。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 基因鉴定 雌性和雄性 APP/PS1 双转基因小鼠种鼠, 适宜环境下饲养, 进行交配, 产下子代, 选择雄性小鼠进行实验, 剪去小鼠尾部 0.5cm 进行 PCR 扩增 PS1 基因 608 bp, 由图 1 可见 2,4,7 样本无 PS1 基因, 1,3,5,6 样本有 PS1 基因。见图 1。



M. 相对分子质量 Marker; 1,3,5,6 条带为 APP/PS1 双转基因小鼠; 2,4,7 条带为野生型 C57 小鼠

图 1 APP/PS1 双转基因小鼠基因鉴定

3.2 一般状态观察 C57 小鼠对照组小鼠活跃、饮食和饮水正常、毛发光亮、毛发黑色、皮肤弹性好、动物粪便排放地点远离睡觉的地方; 模型组小鼠呆板、毛发黄色、背部可见脱毛、皮肤弹性差, 行动迟缓、皮肤松弛; 吡拉西坦组与 BYHWT 高、中剂量组总体状态好于模型组, 低剂量组总体状态与模型组相近。小鼠生长曲线结果显示, 初始体重有差异, 因为小鼠每笼数目 5 只, 彼此之间撕咬, 分笼饲养后各组小鼠的体重整体呈现上升的趋势, 说明小鼠一般状态良好。

3.3 动物脏器指数 与 C57 小鼠对照组相比, 模型组小鼠脾脏和脑的脏器指数均降低 ($P < 0.05$); 经过治疗后, 与模型组比较, BYHWT 高、中剂量组、吡拉西坦组脾脏和脑的脏器指数均高于模型组 ($P < 0.05$), 低剂量组脾脏和脑的脏器指数改变不明显。见表 1。

3.4 海马组织结构变化

3.4.1 海马组织 CA₃ 区 HE 染色 脑组织海马对照组 CA₃ 区神经元分布均匀, 细胞 3~4 层, 形态正常, 排列紧密, 染色均匀, 细胞核清晰; 模型组神经元 2~3 层, 细胞数量较少, 锥体细胞核固缩, 排列紊乱; 阳性药治疗组病理学改变明显改善, 神经元萎缩

表 1 BYHWT 对 AD 小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	脾脏指数 /mg·g ⁻¹	脑指数 /mg·g ⁻¹
对照	-	3.11 ± 0.44	8.10 ± 0.35
模型	-	2.32 ± 0.44 ¹⁾	7.68 ± 0.35 ¹⁾
吡拉西坦	0.62	3.02 ± 0.49 ²⁾	8.06 ± 0.34 ²⁾
BYHWT	37.06	2.88 ± 0.32 ²⁾	7.95 ± 0.28 ²⁾
	18.53	2.96 ± 0.37 ²⁾	7.97 ± 0.28 ²⁾
	9.26	2.51 ± 0.47	7.72 ± 0.32

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

的较少; BYHWT 高剂量组神经元萎缩较少, 排列较规则; 中剂量组神经元萎缩较少, 排列较规则; 低剂量组病理学改变不明显, 神经元 2-3 层, 组织疏松。见图 2。

3.4.2 海马组织 CA₁ 区结构变化 脑组织海马 CA₁ 区 C57 小鼠对照组神经元分布均匀, 形态正常, 细胞核清晰, 核仁清晰, 细胞质清亮; 模型组神经元层数较少排列紊乱, 神经元萎缩, 细胞质空泡较多, 细胞层数减少; 治疗组病理学改变明显改善, 神经元萎缩的较少; BYHWT 高剂量组神经元萎缩较少, 排列较规则; 中剂量组神经元排列较规则; 低剂量组病理学改变不明显, 组织疏松, 细胞层数较少, 见图 3。

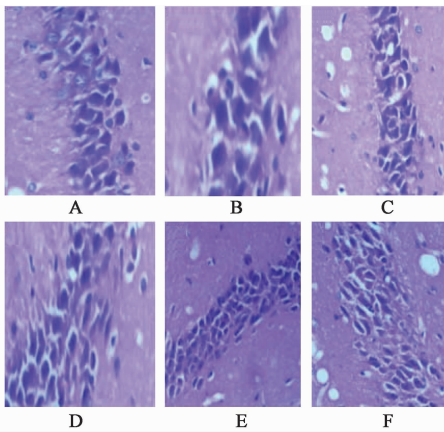
3.5 海马 A β 的检测 结果表明, 与 C57 小鼠对照组比较, 模型组小鼠海马组织 A β 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性药治疗组、BYHWT 中剂量组小鼠海马组织 A β 含量明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 低剂量组小鼠海马组织 A β 的含量降低不明显。见表 2。

表 2 BYHWT 对 AD 小鼠海马 A β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	海马 A β /ng·L ⁻¹
对照	-	361 ± 93
模型	-	464 ± 93 ¹⁾
吡拉西坦	0.62	374 ± 87 ²⁾
BYHWT	37.06	387 ± 76 ²⁾
	18.53	385 ± 86 ²⁾
	9.26	448 ± 72

4 讨论

现代医学指出, AD 的发生是一种复杂的脑组织老化过程, 其中 AD 病变是脑组织出现神经元数量的减少、A β 沉积形成老年斑^[4-5]。人的年龄在不断增长, 老化大脑出现神经元数目减少的区域主要集中在海马、皮质等区域^[6]。海马与机体学习、记忆和内脏活动有密切联系, 还与很多老年性神经系



A. C57 小鼠对照组; B. 模型组; C. 吡拉西坦 0.62 g·kg⁻¹组;
D. BYHWT 37.06 g·kg⁻¹; E. BYHWT 18.53 g·kg⁻¹;
F. BYHWT 9.26 g·kg⁻¹ (图 3 同)

图 2 小鼠海马组织 CA₃ 区 (HE, ×400)

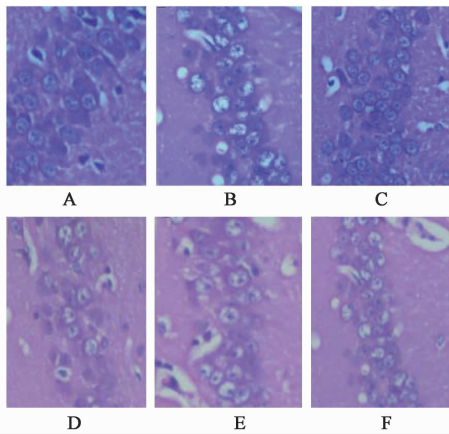


图 3 小鼠海马组织 CA₁ 区 (HE, ×400)

统退行性的疾病都有关系,海马是对 AD 进行研究的重要结构。海马的分区主要包括 CA₁ 区, CA₂ 区, CA₃ 区, DG 区等,研究表明 CA₁ 区, CA₃ 区与学习记忆关联度最大^[7],基于此本实验开展对 CA₁ 区, CA₃ 区形态学研究。

本实验首先对赠送的 APP/PS1 双转基因小鼠进行基因鉴定,确定该小鼠是 AD 小鼠后开始进行实验研究,实验中观察了各组小鼠的生长状态和小鼠的生长曲线,显示该品种小鼠生长状态良好,具备 AD 小鼠的症状,因此本实验选择 APP/PS1 双转基因小鼠为 AD 模型开展实验研究。

实验结束后测定小鼠脾脏和脑的脏器指数,结果显示与对照组相比,模型组小鼠脾脏和脑的脏器指数均明显降低 ($P < 0.05$),提示模型建立成功,AD 小鼠的脏器指数较低;经过治疗后,与模型组比较, BYHWT 高、中剂量组、阳性药治疗组脾脏和脑的脏器指数明显升高 ($P < 0.05$),低剂量组脾脏和

脑的脏器指数改变不明显,说明高、中剂量的 BYHWT 对 AD 小鼠的脏器指数有明显改善作用。

经过 HE 染色显示脑组织海马对照组 CA₃ 区与 CA₁ 区神经元分布均匀,细胞 3~4 层,说明对照组 C57 小鼠海马组织结构正常,神经元未出现病变;模型组神经元层数减少,细胞核固缩,说明 APP/PS1 双转基因模型小鼠海马组织结构异常,神经元的数目减少提示海马的功能减退,进一步说明模型稳定,可以进行实验研究;治疗组、高剂量组、中剂量组神经元萎缩较少,排列较规则,也说明高、中剂量的 BYHWT 对 AD 小鼠的形态学有明显改善作用;这些综合提示高、中剂量的 BYHWT 可以改善 AD 海马区的形态结构。

实验还对 A β 进行了检测,显示与对照组比较,模型组中 A β 的水平明显增加 ($P < 0.05$),提示模型组海马组织 A β 含量高,形成老年斑,引发 AD 疾病,说明模型稳定;同时与模型组比较,治疗组、高、中剂量组的 A β 的水平明显降低 ($P < 0.05$),这些说明 BYHWT 可通过影响 A β 的水平改善 AD 临床症状。

综上所述, BYHWT 可以维持 AD 小鼠海马 CA₁ 区、CA₃ 区神经元的形态结构,改善 AD 小鼠的脑、脾脏的脏器指数、降低 A β 的水平,减轻 AD 的症状,从而保护 AD 小鼠的脑组织结构,延缓机体的老化。

[参考文献]

- [1] WU Yan-lin, Xin Xiao-jie, Xin Xian-liang, et al. Research progress about the regulation of GXXXG structures in the Alzheimer-related protein [J]. Chin Pharmacological Bulletin, 2011, 27 (1): 1.
- [2] 周赛男, 蔺晓源, 易健, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经功能及细胞形态的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 251.
- [3] 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.
- [4] Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease [J]. Indian J Psychiatry, 2009, 51 (1): 55.
- [5] 张康, 吴金娟, 姜淼, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (6): 217.
- [6] Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, et al. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease [J]. Neurochemical Res, 2008, 33 (12): 2390.
- [7] Folstein Marshal, Folstein Susan. Functional expressions of the aging brain [J]. Nutrition Reviews, 2010, 68 (Z2): S70.

[责任编辑 聂淑琴]