

蝙蝠葛酚性碱对阿尔茨海默病模型小鼠 学习记忆和海马的影响

费洪新, 高音*, 孙丽慧, 廉洁, 李林

(齐齐哈尔医学院基础医学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的:**探讨蝙蝠葛酚性碱(PAMD)对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠学习记忆和海马的影响。**方法:**C57BL/6小鼠随机分成对照组,模型组,吡拉西坦组($620\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),PAMD高、中、低剂量组($30,15,7.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。采用D-半乳糖($180\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)ip和双侧海马微量注射($10\text{ }\mu\text{g}$) β -淀粉样蛋白 $_{1-42}$ ($A\beta_{1-42},2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导AD模型小鼠。所有小鼠给予等体积药物或生理盐水ig,持续28d。采用Morris水迷宫测试行为学指标,观察小鼠学习记忆能力及小鼠海马镜下形态结构,采用双抗体夹心法测定脑组织 β -淀粉样蛋白($A\beta$)和白介素-6(IL-6)水平。**结果:**与对照组比较,模型组小鼠潜伏期和游泳距离明显增加($P < 0.05$), $A\beta$ 和IL-6水平明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,PAMD高、中剂量组明显改善AD模型小鼠的学习记忆能力($P < 0.05$),明显改善海马神经元的细胞形态,明显降低 $A\beta$ 和IL-6的水平($P < 0.05$)。**结论:**PAMD改善AD模型小鼠的学习记忆功能及海马神经元的形态结构,PAMD通过抑制 $A\beta$ 和IL-6蛋白在AD治疗中发挥重要作用。

[关键词] 蝙蝠葛酚性碱;阿尔茨海默病;海马

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0091-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070091

Effect of Phenolic Alkaloids of *Menispermum dauricum* on Learning and Memory and Hippocampal in Alzheimer's Disease Model Mouse FEI Hong-xin, GAO Yin*, SUN Li-hui, LIAN Jie, LI Lin (*Basic Medical College, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum* (PAMD) on the learning and memory and hippocampal in Alzheimer's disease (AD) model mouse. **Method:** C57BL/6 mouse were randomly divided into control group, Piracetan group ($620\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PAMD high-dose group ($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PAMD medial-dose group ($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PAMD low-dose group ($7.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). By using intraperitoneal injection of D-galactose ($180\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in combination with microinjection of $10\text{ }\mu\text{g}$ incubated amyloidbeta protein $_{1-42}$ ($A\beta_{1-42},2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) into the dorsal blade of the dentate gyrus in the bilateral hippocampus of mouse an AD model mouse was induced. All the mice were ig administrated with drugs or water in the same volume for 28 days. The Morris water maze was used to observe the learning and memory ability. After the treatment all animals were sacrificed, morphology of hippocampus was observed. Biochemical methods were used to determine the content of $A\beta$ and interleukin-6 (IL-6) in the brain tissue. **Result:** Compared with the control group, model group latencies and swimming distances significantly prolonged ($P < 0.05$), $A\beta$ and IL-6 significantly increased ($P < 0.05$); compared with the model group, PAMD high-dose group and PAMD medial-dose group could significantly improve the learning and memory ability of model mouse ($P < 0.05$). In PAMD high-dose group and PAMD medial-dose group, the brain maintain normal morphological structure of nerve cells and the number of nerve cells was significantly increased, $A\beta$ and IL-6 were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** PAMD could improve the ability of learning and memory of AD model mouse. PAMD can maintain

[收稿日期] 20140804(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373777,81173599);教育部科学技术重点项目(210068)

[第一作者] 费洪新,在读博士,讲师,从事老年性痴呆、肿瘤、痛风研究,Tel:13514641639. E-mail:feihongxin2008@163.com

[通讯作者] *高音,博士,教授,硕士生导师,从事老年性痴呆、脑损伤分子机制研究,Tel:0452-2663325, E-mail:gyqj329@163.com

normal morphological structure of nerve cells of AD mice. PAMD plays a certain role in the treatment of AD through inhibiting $A\beta$ and IL-6.

[Key words] phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum*; Alzheimer's disease; hippocampal

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种临床上常见的老年性疾病,其主要病理变化是老年斑 (senile plaque, SP) 的形成^[1]。SP 的核心成分是 β -淀粉样蛋白 (amyloid beta protein, $A\beta$), $A\beta$ 大量沉积后引发小胶质细胞炎症反应,反过来刺激 $A\beta$ 产生,引发 AD 疾病^[2]。因此在 AD 患者脑组织 $A\beta$ 及炎症相关因子白介素-6 (IL-6) 等出现异常。

蝙蝠葛酚性碱 (phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum*, PAMD) 是祖国医药北豆根提取出来的脂溶性生物碱的混合物^[3]。PAMD 药理作用十分广泛,包括抗脑缺血作用、抗脑缺血再灌注作用、抗肿瘤作用、改善学习记忆障碍、抗氧化作用等^[4]。本课题组前期研究表明,PAMD 可以抑制多种肿瘤细胞的增殖^[5-8],但对 PAMD 抗 AD 方面研究目前国内尚属于空白。本课题开展 PAMD 对 AD 海马行为学、形态学、海马组织密切相关的因子 $A\beta$ 及其炎症相关因子 IL-6 的研究,探寻 PAMD 对 AD 小鼠影响及其机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 8 周龄清洁级 C57BL/6 小鼠,体重 (23 ± 2) g,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。黑龙江中医药大学实验动物中心常温、常湿饲养动物,动物自由摄取食物和饮用水。

1.2 药物及试剂 吡拉西坦 (湖南迪诺制药有限公司,批号 130325),PAMD (黑龙江中医药大学中医药研究院周忠光教授提供北豆根原材料,黑龙江中医药大学王栋教授从北豆根中提取 PAMD,提取的 PAMD 纯度是 99.2%,PAMD 采用生理盐水溶解), $A\beta_{1-42}$ (Sigma 公司), $A\beta$,IL-6 酶联免疫试剂盒 (南京建成生物工程研究所生产批号 20140401),其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 ZH-DSG 型 Morris 水迷宫 (安徽淮北正华生物仪器设备有限公司),PLZOZ-S 型电子天平 (沈阳龙腾电子称量仪器有限公司),TGL-16G 型台式离心机 (上海安亭科学仪器厂),6100 型 RT-雷杜酶标仪 (美国 RT 公司),TCNAI-G2 型透射电子显微镜 (荷兰公司)。

2 方法

2.1 小鼠 AD 模型的复制 C57BL/6 小鼠水合氯

醛麻醉后,剪去顶部毛发,固定小鼠,微量加样器双侧脑室海马区一次性注入 10 μ g 凝聚态 $A\beta_{1-42}$ (2 g·L⁻¹),针头留下 10 min,缓慢退针,骨蜡封闭,包扎小鼠,同时小鼠 ip D-半乳糖 (180 mg·kg⁻¹);对照组双侧脑室注射等量的生理盐水,同时 ip 等量的生理盐水。

2.2 动物分组和给药方案 小鼠 36 只随机分为对照组、模型组、吡拉西坦组、PAMD 高、中、低剂量组。每组 6 只。对照组、模型组小鼠 ig 给予生理盐水,吡拉西坦组 ig 给予吡拉西坦 620 mg·kg⁻¹,PAMD 高、中、低剂量组 ig 给予 PAMD 30, 15, 7.5 mg·kg⁻¹,连续给药 28 d。

2.3 检测 AD 小鼠定位航行能力 Morris 水迷宫仪器水深 20 cm,水温 (23 ± 2) °C,平台放于第四象限,没于水下 1 cm,第 1, 2, 3, 4 天为训练时间,每次训练为 60 s。第 5 天为测试时间,观察小鼠到达平台位置的潜伏期时间,以此来衡量小鼠的定位航行能力。

2.4 检测 AD 小鼠空间探索能力 过程同 2.3,在测试第 5 天撤去平台,检测在 60 s 内小鼠找到平台游泳距离作为衡量小鼠空间探索能力。

2.5 检测脑组织海马 CA₃ 区结构 实验结束后,水合氯醛麻醉小鼠,左心室缓慢灌注 100 mL 生理盐水,然后再用 4% 多聚甲醛缓慢匀速灌注固定,断头取脑组织固定于 4% 多聚甲醛之中,常规制备石蜡切片,HE 染色,光学显微镜观察脑组织海马 CA₃ 区组织结构。

2.6 透射电镜检测脑组织海马 CA₃ 区结构 小鼠实验结束后,心脏灌注 100 mL 生理盐水,然后再用戊二醛灌注,取材小鼠脑组织海马部位,2.5% 戊二醛固定、四氧化锇固定、脱水、包埋、切片等过程,电子显微镜观察脑组织海马 CA₃ 区组织结构。

2.7 检测小鼠脑组织海马 $A\beta$ 和 IL-6 的含量 实验结束后小鼠断头,取脑组织海马,匀浆,静置,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,分装, -20 °C 保存。在酶标仪上 450 nm 波长处测定吸光度 (A),绘制标准曲线,求得脑海马 $A\beta$ 和 IL-6 含量。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PAMD 对 AD 小鼠定位航行能力及空间探索能力的影响 与对照组比较,模型组小鼠潜伏期明显增加($P < 0.05$),游泳距离明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,吡拉西坦治疗组,PAMD 高、中剂量组小鼠潜伏期明显缩短($P < 0.05$),游泳距离明显缩短($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 PAMD 对 AD 小鼠海马潜伏期及游泳距离的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effects of PAMD on learning and swimming distances of hippocampal tissue in AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	潜伏期 /s	游泳距离 /cm
对照	-	18 ± 9	560 ± 97
模型	-	39 ± 9 ¹⁾	1 169 ± 100 ¹⁾
吡拉西坦	620	22 ± 10 ²⁾	770 ± 146 ²⁾
PAMD	30	29 ± 7 ²⁾	843 ± 67 ²⁾
	15	28 ± 6 ²⁾	813 ± 54 ²⁾
	7.5	37 ± 8	1 096 ± 169

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

3.2 对 AD 小鼠脑组织海马 CA₃ 区的影响 对照组海马神经元分布均匀,细胞 4~5 层,细胞核清晰;模型组神经元 2~3 层,排列紊乱,细胞质较少;吡拉西坦组细胞分布均匀,细胞质丰富;PAMD 高、中剂量组神经元萎缩较少、细胞 3~4 层、排列比较规则,细胞形态比较清晰;PAMD 低剂量组细胞 2~3 层,细胞质染色浅。见图 1。

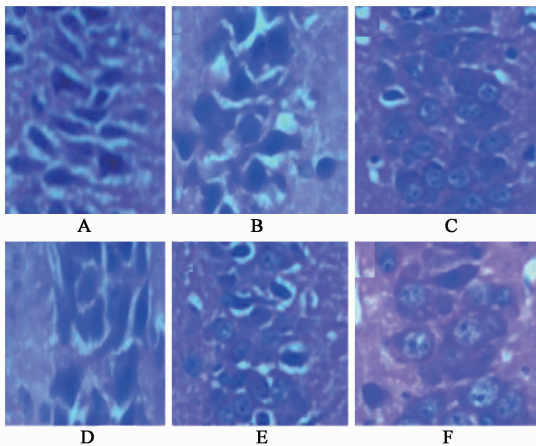


图 1 PAMD 对 AD 小鼠海马组织 CA₃ 区的影响(HE, ×400)
Fig.1 Effects of PAMD on CA₃ area of hippocampal tissue in AD mice(HE, ×400)

3.3 对 AD 小鼠脑组织海马 CA₃ 区超微结构的影响 对照组海马神经元细胞质丰富,线粒体丰富,核膜清晰;模型组神经元细胞器较少,线粒体较少;吡拉西坦组海马神经元细胞器较多,线粒体、内质网轻度肿胀;PAMD 高、中剂量组海马神经元细胞器丰富,线粒体较多,内质网轻度肿胀;PAMD 低剂量组粗面内质网明显肿胀。见图 2。

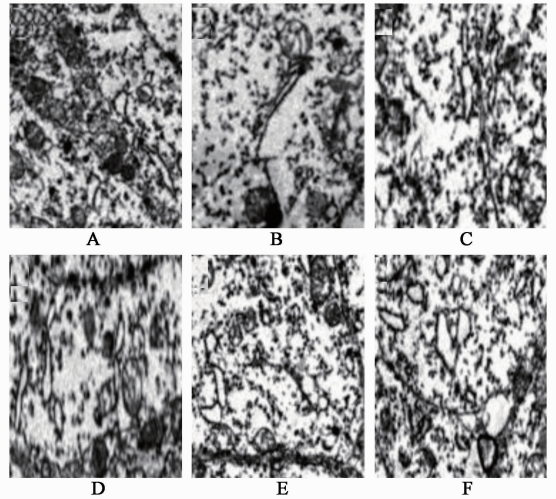


图 2 PAMD 对 AD 小鼠海马组织超微结构的影响(透射电镜, ×16 500)
Fig.2 Effects of PAMD on electron microscopy of hippocampal tissue in AD mice. (transmission electron microscope, ×16 500)

3.4 对 AD 小鼠海马组织 A β 和 IL-6 表达的影响 与对照组比较,模型组小鼠脑组织海马 A β 和 IL-6 含量明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,吡拉西坦组,PAMD 高、中剂量组小鼠脑海马 A β 和 IL-6 含量明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 PAMD 对 AD 小鼠海马组织 A β 和 IL-6 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Effects of PAMD on A β and IL-6 of hippocampal tissue in AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	A β /ng·L ⁻¹	IL-6/ μ g·L ⁻¹
对照	-	264.3 ± 50.1	4.6 ± 0.5
模型	-	386.2 ± 41.5 ¹⁾	6.3 ± 0.8 ¹⁾
吡拉西坦	620	277.9 ± 69.8 ²⁾	5.0 ± 0.6 ²⁾
PAMD	30	294.2 ± 44.7 ²⁾	5.4 ± 0.9 ²⁾
	15	288.3 ± 47.4 ²⁾	5.3 ± 0.7 ²⁾
	7.5	342.0 ± 46.9	6.0 ± 0.8

4 讨论

AD 是人类继心血管疾病、肿瘤和中风之后的第四大疾病^[9]。AD 小鼠早期主要表现为学习、记忆能力减退^[10],并且许多蛋白质参与 AD 发生机

制,例如 $A\beta$, IL-6, TNF- α , 白介素-1 β (IL-1 β) 等^[11-12]。因此本实验采用水迷宫检测小鼠的学习、记忆能力,并且开展对 $A\beta$ 和 IL-6 的检测。AD 的研究有很多模型,例如快速老化小鼠模型^[13]、注射 D-半乳糖模型^[14]、注射 $A\beta$ 模型^[15] 等。基于此本实验采用腹腔注射 D-半乳糖及双侧脑室注射 $A\beta$ 建立 AD 模型。

课题组前期研究表明 PAMD 20, 10 mg·kg⁻¹ 对肿瘤细胞就有明显的作用^[8], 结合 PAMD 对心肌缺血保护作用的研究^[16], PAMD 剂量分别是 30, 15, 7.5 mg·kg⁻¹, 因此本课组选择 PAMD 30, 15, 7.5 mg·kg⁻¹ 作用 AD 模型小鼠开展实验研究。

实验潜伏期、游泳距离的检测结果显示,与对照组比较,模型组小鼠潜伏期和游泳距离明显增加 ($P < 0.05$), 说明模型组 AD 小鼠学习、记忆能力减退,模型建立成功;与模型组比较,PAMD 高、中剂量组小鼠潜伏期和游泳距离明显缩短,说明 PAMD 高、中剂量可以明显改善 AD 小鼠的学习、记忆能力。

海马 CA₃ 区与学习记忆关联很大,因此测定海马 CA₃ 结构。形态学观察对照组海马结构正常,适宜为对照组。经过治疗后,PAMD 高、中剂量组结构恢复,说明 PAMD 高、中剂量明显改善 AD 小鼠的海马结构,使海马的损伤减轻,海马结构有不同程度的恢复。

与对照组比较,模型组小鼠的脑组织 AD 发病的中心环节成分 $A\beta$ 含量明显升高,同时炎症因子 IL-6 含量明显升高,说明模型组炎症反应明显,模型稳定;与模型组比较,PAMD 高、中剂量组小鼠海马组织 $A\beta$ 和炎症因子 IL-6 含量明显降低 ($P < 0.05$),也说明了 PAMD 高、中剂量明显改善小鼠脑组织的炎症反应,减少 $A\beta$ 的产生,提示 $A\beta$ 与 IL-6 是 AD 的重要评价指标,也提示在 AD 小鼠脑组织 $A\beta$ 与 IL-6 存在相关性。

综上所述,PAMD 能改善 AD 模型小鼠的学习、记忆功能,改善脑组织形态学结构,减轻炎症反应,PAMD 通过抑制 $A\beta$ 和 IL-6 蛋白水平在 AD 治疗中发挥重要作用,具体的机制还有待于进一步的实验研究。

[参考文献]

[1] 张赓,吴金娟,姜森,等. 中医药治疗阿尔兹海默病

的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6): 217-222.

[2] Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease[J]. Indian J Psychiatry, 2009, 51(1): 55-61.

[3] 鲁美君,苏云明. 蝙蝠葛酚性碱的药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2013,30(3): 150-152.

[4] 苏云明,沈越,秦鹏飞,等. 蝙蝠葛酚性碱药理作用研究现状[J]. 中医药信息,2014,31(1): 113-114.

[5] 苏云明,肖佳音,王国志,等. 蝙蝠葛酚性碱对肿瘤细胞 PC-3, BT6537 增殖的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报,2007,41(2): 129-131.

[6] 苏云明,孟繁兴,王欣,等. 蝙蝠葛酚性碱对 K562、BxPc-3 增殖的影响[J]. 甘肃中医学院学报,2008,25(3): 1-4.

[7] 白云,李洋,朴成玉,等. 蝙蝠葛酚性碱及其单体成分对胰腺癌细胞 BxPC-3 细胞增殖作用的影响[J]. 中国中医药科技,2013,20(5): 482-483.

[8] 苏慧,刘晓辉,章艳,等. 蝙蝠葛酚性碱对胃癌 SGC-7901 细胞 ICAM-1, FasL mRNA 表达的影响[J]. 中医药信息,2014,31(3): 22-24.

[9] 苏芮,韩振蕴,范吉平,等. 阿尔茨海默病中医病因病机探讨[J]. 中华中医药杂志,2010,25(5): 743-744.

[10] 叶芸,张文均,刘柳,等. APP/PS1 双转基因小鼠早期记忆功能障碍与胆碱能系统的关系研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2012,19(2): 112-115.

[11] 孙京华,钟萍. 血管性痴呆炎症细胞因子[J]. 蚌埠医学院学报,2012,37(2): 228-230.

[12] Wu X, Lu Y, Dong Y, et al. The inhalation anesthetic isoflurane increases levels of proinflammatory TNF- α , IL-6, and IL-1 β [J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(7): 1364-1378.

[13] 陶彦谷,黄启辉. 脑还丹对快速老化小鼠 SAMP/8 学习记忆能力及海马 APP, Pin1, HMGB1 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013, 19(22): 259-265.

[14] 蔡大勇,黄启福,陈金星,等. 丹榭逍遥散防治 D-半乳糖拟阿尔茨海默病的抗自由基损伤机制[J]. 中国药师,2004,7(1): 3-6.

[15] 张云鹤,张一娜,刘歆,等. $A\beta_{1-42}$ 诱导原代海马神经细胞建立阿尔茨海默病细胞模型[J]. 中国老年学杂志,2011,31(11): 2027-2029.

[16] 黎培员,李英茜,杨晓燕,等. 蝙蝠葛酚性碱对心肌缺血及缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志,2012,28(7): 518-521.

[责任编辑 聂淑琴]