

补肾化痰益智法对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响

许湘, 石和元, 孔明望, 丁莉, 潘怡宏, 王平*

(湖北中医药大学老年医学研究所, 湖北省老年病中药新产品协同创新中心, 武汉 430065)

[摘要] 目的:观察补肾化痰益智法对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响并探讨其可能机制。方法:随机将 APP/PS1 双转基因小鼠分为模型组、西药多奈哌齐组($6.5 \times 10^{-4} \text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、补肾化痰益智方高、低剂量组($15.6, 7.8 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 每组 10 只。空白组为 10 只同月龄相同遗传背景 C57BL/6J 小鼠。从 3 月龄开始对小鼠分别实施灌胃治疗, 每日 1 次。空白组、模型组均给予等容积的生理盐水灌胃。连续灌胃 3 个月后, 进行跳台实验及穿梭箱实验评定各组小鼠的学习记忆能力; 采用比色法检测小鼠脑组织超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量。结果:跳台实验结果显示, 与模型组比较, 各组小鼠的潜伏期明显延长和出错次数明显减少($P < 0.01$); 穿梭箱实验结果显示, 与模型组比较, 各组小鼠的主动回避次数明显增加($P < 0.01, P < 0.05$), 主动回避潜伏期、被动回避潜伏期明显缩短($P < 0.01$); 西药组和补肾化痰益智方高、低剂量组小鼠脑组织中 SOD 活性较模型组显著升高($P < 0.01$), MDA 含量明显降低($P < 0.01$)。结论:补肾化痰益智方对 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆具有一定的改善作用, 且可能与其抗氧化作用有关。

[关键词] 补肾化痰益智方; 阿尔茨海默病; 跳台实验; 穿梭箱实验; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0102-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080102

Effect of Replenishing Kidney-essence and Removing Phlegm on Ability of Learning and Memory and Antioxidant in APP/PS1 Double Transgenic Mice XU Xiang, SHI He-yuan, KONG Ming-wang, DING Li, PAN Yi-hong, WANG Ping* (Institute of Geratology, Hubei University of Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine of New Products for Geriatrics, Hubei Province, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of replenishing kidney-essence and removing phlegm on the ability of learning and memory and antioxidant in APP/PS1 double transgenic mice. **Method:** APP/PS1 double mice were randomly divided into model group, western medicine group ($6.5 \times 10^{-4} \text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Bushen Huatan Yizhi recipe (BSHTYZR) high dose group ($15.6 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), low dose group ($7.8 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 10 in each groups. Blank group mice (C57BL/6J) were 10 months of age with the same genetic background mice. After intragastrical administration for 3 months, the ability of learning and memory was assessed by the step down avoidance test and shuttle box test; colorimetric assay was used to measure mouse brain tissue superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) content. **Result:** Step down avoidance test results showed that compared with model group, each group of mice significantly prolonged the incubation period and the number of errors decreased significantly ($P < 0.01$); shuttle box test results showed that compared with model group, the number of active avoidance in treatment groups increased significantly ($P < 0.01, P < 0.05$), and active avoidance incubation period, the passive avoidance period significantly shorten ($P < 0.01$); shuttle box test results showed that compared with the model group, in the rest of the administration group the small active

[收稿日期] 20141001(002)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130064);湖北省首届医学领军人才专项(5406-0063)

[第一作者] 许湘, 博士在读, 讲师, 从事脑病及老年脑病中医药防治规律研究, Tel:027-68890127, E-mail: xuxiang216@sina.com

[通讯作者] *王平, 博士, 二级教授, 博士生导师, 从事脑病及老年脑病中医药防治规律研究, Tel:027-68890008, E-mail: pwang54@aliyun.com

avoidance significantly increased the number of rats ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while the active avoidance latency and passive avoidance latency was shorter ($P < 0.01$); in addition, in BSHTYZR high dose group and low dose group SOD activity of brain tissue increased significantly compared with the model group ($P < 0.01$), MDA was significantly lower than the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** BSHTYZR has a certain improvement on APP/PS1 double transgenic mice learning and memory, and may be related to the antioxidant effects.

[Key words] Bushen Huatan Yizhi recipe; Alzheimer's disease; step down avoidance test; shuttle-box test; antioxidant

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性退行性神经疾病,多发生在 65 岁以上的老年人群。其起病隐匿,患者逐渐出现认知功能障碍、记忆力减退、行为异常和社交障碍,且病情呈进行性加重^[1]。随着中国社会老龄化程度的加重,AD 已成为影响我国可持续发展的一个重要因素,也是全世界最大的慢性病,因此对此病的治疗是目前研究热点之一^[2-3]。中医学认为,AD 的关键病机在于肾精亏虚、髓海不足,痰浊阻滞、清窍不养^[4]。多年来,导师在王平教授临床上应用补肾化痰益智法治疗 AD 有一定疗效^[5]。课题组前期研究结果也表明补肾化痰益智法对神经细胞具有较好的保护作用,能够抑制 APP mRNA 的表达,以降低其毒性作用^[6]。本实验选用目前国际公认最佳 AD 小鼠模型——APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠,进行跳台实验、穿梭箱实验,观察不同给药组小鼠学习记忆的改变。从抗氧化角度出发,选取超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 等相关脑组织生化指标检测以阐明其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠 40 只,3 月龄,雄性,购自中国医学科学院实验动物研究所,合格证号 SCXK(京)2013-0002。同月龄相同遗传背景 C57BL/6J 小鼠 10 只,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

饲养房间温度 24 ~ 26 °C,湿度 50% ~ 60%,光照 12 h,黑暗 12 h。所有动物均饲养于独立通风系统中。实验过程中动物自由摄食和饮水。所有动物实验操作过程符合实验动物管理与保护相关准则。

1.2 药物与试剂 补肾化痰益智方由熟地黄 12 g,姜半夏 10 g,竹茹 10 g 等组成,水蒸气蒸馏法提取挥发油,正交实验法煎煮,乙醇回收,合并浓缩成浸膏备用(湖北虎泉药业有限公司中试车间加工)。盐酸多奈哌齐片(卫材药有限公司,批号 H20050978),考马斯亮蓝试剂盒(批号 20130416),

MDA 试剂盒(批号 20130509),SOD 试剂盒(批号 20130329),均为南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 S8 智能型独立通风系统(苏州市苏杭科技器材有限公司),ZH-800 型小鼠跳台记录仪(淮北正华生物仪器设备有限公司),小鼠穿梭箱试验记录仪(淮北正华生物仪器设备有限公司),UV2200 型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 随机将 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠分为 4 组,分别为模型组、西药多奈哌齐组($6.5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、补肾化痰益智方高剂量组($15.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、低剂量组($7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组 10 只。空白对照组(以下简称空白组)为 10 只同月龄相同遗传背景 C57BL/6J 小鼠。从 3 月龄开始对小鼠分别实施灌胃治疗,每日 1 次,连续灌胃 3 个月。

2.2 跳台实验 末次给药后 24 h,将动物置于跳台仪中,应用小鼠跳台记录仪进行小鼠学习记忆能力测试。跳台实验第 1 天先将小鼠置于跳台记录仪中适应 3 min,插上电源使底面铜栅通电,电压 36 V,连续通电 5 min,当小鼠受到电击后,其正常逃避反应为跳上橡皮台。学习训练结束 24 h 后开始正式测试,测试仪记录小鼠第 1 次跳下平台的时间即潜伏期和 5 min 内跳下台的次数即测试期错误次数。

2.3 穿梭箱实验 实验前设计循环次数为 30 次,间隔时间为 5 s,蜂鸣时间为 5 s,电击时间为 10 s,电压 70 V。实验共 5 d,每天 1 次。前 4 d 为训练期,第 5 天正式实验,记录:①主动逃避次数(active avoidanceresponse times, AART)。②主动逃避反应时间:即主动回避潜伏期(active avoidance re-sponse latency, AARL)。③电击时间即为被动逃避潜伏期(eacape response latency, ERL)。

2.4 小鼠脑组织 SOD 和 MDA 含量测定 行为学试验结束后,小鼠立即断头处死,在冰上迅速剥离脑组织,在 4 °C 预冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤

纸拭干,称重后,加入冷生理盐水,于匀浆管中充分研碎,制成 10% 脑组织匀浆,以 $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液备用,保存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中。取以上 10% 脑组织匀浆上清液适量,用比色法测定 SOD,MDA,具体操作步骤及计算公式按试剂盒说明书进行,公式中所需的蛋白含量按照考马斯亮蓝试剂盒说明用比色法测定。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 跳台测试 与空白组比较,模型组小鼠的潜伏期明显缩短和出错次数明显增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠的潜伏期明显延长和出错次数明显减少 ($P < 0.01$);与西药多奈哌齐对照组比较,补肾化痰益智方高、低剂量组小鼠的潜伏期和出错次数无显著差异,但有量效关系。见表 1。

表 1 补肾化痰益智方对 APP/PS1 双转基因小鼠跳台试验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of BSHTYZR on step down avoidance test of APP/PS1 double transgenic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	潜伏期/s	出错数/次
空白	-	174 ± 49 ¹⁾	2.0 ± 0.7 ¹⁾
模型	-	63 ± 20	5.3 ± 1.2
多奈哌齐	6.5 × 10 ⁻⁴	111 ± 32 ¹⁾	3.3 ± 1.0 ¹⁾
补肾化痰益智方	15.6	144 ± 43 ¹⁾	2.9 ± 0.7 ¹⁾
	7.8	102 ± 34 ¹⁾	3.2 ± 0.9 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 穿梭箱检测 与空白组比较,模型组小鼠的主动回避次数明显减少 ($P < 0.01$),主动回避潜伏期、被动回避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组小鼠的主动回避次数明显增加 ($P < 0.01, P < 0.05$),主动回避潜伏期、被动回避潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$);与多奈哌齐组比较,补肾化痰益智方高剂量组小鼠的主动回避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 小鼠脑组织中 SOD 和 MDA 含量测定 与空白组比较,模型组小鼠脑组织中 SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$);西药组和补肾化痰益智方高、低剂量组小鼠脑组织中 SOD 活性较模型组显著性升高 ($P < 0.01$);小鼠脑组织中 MDA 含量检测结果显示,与空白组相比,模型组小鼠脑组织中 MDA 含量显著

表 2 补肾化痰益智方对 APP/PS1 双转基因小鼠穿梭箱学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of BSHTYZR on shuttle-box test of APP/PS1 double transgenic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	AART /次	AARL /s	ERL /s
空白	-	19.9 ± 5.8 ²⁾	20 ± 6 ²⁾	8 ± 2 ²⁾
模型	-	8.0 ± 2.7	81 ± 19	25 ± 7
多奈哌齐	6.5 × 10 ⁻⁴	20.3 ± 5.1 ²⁾	53 ± 12 ¹⁾	11 ± 3 ²⁾
补肾化痰益智方	15.6	19.9 ± 6.3 ²⁾	23 ± 7 ^{2,3)}	7 ± 2 ²⁾
	7.8	15.1 ± 4.9 ¹⁾	43 ± 10 ^{2,3)}	9 ± 3 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与多奈哌齐组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

性升高 ($P < 0.01$),而补肾化痰益智方高、低剂量组和西药组小鼠脑组织中 MDA 含量明显低于模型组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 补肾化痰益智方对 APP/PS1 双转基因小鼠脑组织 SOD 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of BSHTYZR on SOD activity and MDA content of APP/PS1 double transgenic mice brain tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	SOD / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	MDA / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	103 ± 19 ¹⁾	9.8 ± 3.0 ¹⁾
模型	-	43 ± 9	27.1 ± 4.7
多奈哌齐	6.5 × 10 ⁻⁴	84 ± 12 ¹⁾	12.4 ± 2.8 ¹⁾
补肾化痰益智方	15.6	90 ± 13 ¹⁾	11.2 ± 0.9 ¹⁾
	7.8	74 ± 43 ¹⁾	13.4 ± 3.0 ¹⁾

4 讨论

研究发现, β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 在脑内广泛沉积及其神经毒性作用可致进行性认知功能障碍,是 AD 病理机制的中心环节。本实验选用的 APP/PS1 双转基因小鼠能很好模拟 AD 早期的学习记忆障碍,是研究 AD 公认的理想模型。该小鼠出生后 2~3 个月即可在脑内检测到 $A\beta$ 的沉积^[7],在“治未病”的医学思想指导下,笔者在其脑内 $A\beta$ 形成初期即进行药物干预,继而观察药物改善学习记忆的疗效;此外,选用雄性小鼠可以避免雌激素对药物效果的干扰。学习记忆最基础的一环就是条件反射的建立。跳台和穿梭箱实验分别测定动物被动和主动回避危险的能力,可反映动物的学习记忆能力。本行为学实验结果提示,APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠的空间学习和记忆能力显著下降;补肾化痰益智方可以明显提高 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠

的学习记忆能力。

超氧自由基导致的氧化损伤是 AD 病理变化的重要机制^[8]。在脑组织中,正常自由基产生和消除的速率维持着一种动态平衡,而当 A β 沉积时,这种平衡被打破。过度表达 APP 的转基因鼠脑实质中有 A β 沉积并伴随着氧化损伤,在 AD 患者脑中也有着相应的氧化应激损伤^[9]。脑内 A β 沉积引起的氧化应激反应可导致 DNA, RNA, 蛋白质, 脂质等过氧化^[10], 而氧化应激反应又可对蛋白质结构造成硝基化、羰基化等多种形式的修饰。结构的改变引起蛋白质功能异常,酶活性的降低,从而致细胞正常生理功能受到影响,甚至细胞的凋亡。故抗氧化是研究 AD 防治方法的重要途径。SOD 是超氧自由基清除剂,其活力反映机体清除氧自由基的能力;MDA 是体内过氧化作用的最终产物,其含量高可间接反映细胞受自由基攻击的严重程度^[11]。本实验结果显示 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠脑内 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显增高;与模型组比较,补肾化痰益智方高、低剂量组对 APP/PS1 双转基因小鼠抗氧化作用具有显著的改善作用。提示其可能与改善 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠学习记忆障碍密切相关。

综上所述,本研究发现补肾化痰益智方可改善 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠学习记忆能力。其机制可能为通过该药的抗氧化作用使 A β 蛋白沉积导致的神经毒性作用减弱。

[参考文献]

[1] 李晓晴,王力,冯立群,等. 阿尔茨海默病的发病机制和细胞周期假说 [J]. 中华神经医学杂志, 2011, 10 (7): 752-754.
[2] Chen Zheng, Yu Jia, Song Yuetao, et al. Aging Beijing;

Challenges and strategies of health care for the elderly [J]. Ageing Res Rev, 2010, 9 (Suppl 1): S2-S5.

[3] 费洪新,周忠光,姜波,等. 补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠学习记忆及海马 β 淀粉样前体蛋白的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (20): 125-128.
[4] 胡玉萍,王平,孔明望,等. 补肾化痰益智法对阿尔茨海默病细胞模型 NF- κ B 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33 (24): 6190-6192.
[5] 张书,王平. 王平运用补肾化痰法治疗老年疑难杂症经验 [J]. 中医杂志, 2013, 54 (8): 705-706.
[6] 胡玉萍,王平,孔明望,等. 补肾化痰益智法对 AD 细胞模型 APPmRNA 表达的影响 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2013, 15 (6): 1303-1308.
[7] Gordon M N, Holeomb L A, Jantzen P T, et al. Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1⁺ APP mouse [J]. Exp Neurol, 2002, 173 (2): 183-195.
[8] Giasson B I, Ischiropoulos H, Lee V M, et al. The relationship between oxidative nitritative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. Free Radical Biol Med, 2002, 32 (12): 1264-1275.
[9] LaFerla F M. An array of genes implicated in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2006, 27 (8): 1078-1080.
[10] Ji C, Aisa H A, Yang N, et al. Gossypium her baceum extracts inhibited NF-kappa B activation to attenuate spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration induced by amyloid-beta in rats [J]. J Alzheimers Dis, 2008, 14 (3): 271-283.
[11] Zhang Y, Mc Laughlin R, Goodyer C, et al. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons [J]. J Cell Biol, 2002, 156 (3): 519-529.

[责任编辑 聂淑琴]