

益肾化浊方对 AD 大鼠海马突触形态 及 Ca^{2+} 相关激酶表达的影响

宋宛珊^{1,2}, 王红秀¹, 张玉莲^{2*}, 张琳琳², 孙伟明¹, 王凯¹

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150)

[摘要] 目的:观察益肾化浊方(YSHZR)对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠海马区神经元突触形态学和 Ca^{2+} 相关激酶钙调蛋白激酶 II (CaMK II), 蛋白激酶 C(PKC)表达的影响,初步探讨 YSHZR 治疗 AD 的作用机制。方法:将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,YSHZR 低、中、高剂量组。往大鼠左侧侧脑室注射聚集态的 β -淀粉样蛋白片段 25-35 ($A\beta_{25-35}$) 制备 AD 模型。各剂量组造模后分别按 2.8, 5.6, 11.2 $g \cdot kg^{-1}$ 剂量灌胃给予 YSHZR,假手术组与模型组给予等体积生理盐水灌胃,每日灌胃 1 次,持续 4 周。采用电子显微镜观察大鼠海马区神经元突触数量和形态学结构,Western blot 法检测海马区 CaMK II 和 PKC 表达水平。结果:与假手术组相比,模型组大鼠海马区突触间隙融合模糊不清,突触前成分重度水肿,突触小泡重度减少,大小不均一,线粒体绝大部分嵴和膜融合消失,模糊不清,有嵴断裂现象及空泡现象,YSHZR 低、中、高 3 个剂量组均可一定程度地改善突触形态,以低剂量组尤为明显;与模型组相比,YSHZR 低剂量组间隙清晰的突触数量显著增加 ($P < 0.05$);YSHZR 各剂量组间隙部分融合的突触数量无明显变化;但间隙完全融合的突触数量均显著低于模型组 ($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组大鼠海马区 CaMK II 和 PKC 的表达水平明显下降 ($P < 0.05$),YSHZR 各剂量组均能显著上调 CaMK II 和 PKC 的表达 ($P < 0.05$)。结论:YSHZR 可能通过改善 AD 模型大鼠海马区突触形态学,并促进海马区 CaMK II 和 PKC 的表达,从而发挥治疗 AD 的作用。

[关键词] 阿尔茨海默病; 益肾化浊方; 突触形态学; 钙调蛋白激酶 II; 蛋白激酶 C

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0097-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150097

Effects of Yishen Huazhuo Recipe on Synaptic Morphology and Expression of Ca^{2+} Related Kinase in Hippocampus of Rats with Alzheimer's Disease SONG Wan-shan^{1,2}, WANG Hong-xiu¹, ZHANG Yu-lian^{2*}, ZHANG Lin-lin², SUN Wei-ming¹, WANG Kai¹ (1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China; 2. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effects of Yishen Huazhuo recipe (YSHZR) on the synaptic morphology and the expression of Ca^{2+} related kinase, calmodulin kinase II (CaMK II) and protein kinase C (PKC), in the hippocampus of Alzheimer's disease (AD) rat, and explore the mechanism of YSHZR on the treatment of AD. **Method:** Fifty male SD rats were randomly divided into the sham group, model group, low, middle and high dose group of YSHZR. The β -amyloid fragment 25-35 ($A\beta_{25-35}$) was injected into the left lateral ventricle of rats to establish AD rat model. Each dose group was treated by oral administration with 2.8, 5.6, 11.2 $g \cdot kg^{-1}$ of YSHZR, sham group and model group were given an equal volume of normal saline, and gavaged once daily for 4 weeks. The morphological changes of synapses in the rat hippocampus were observed by an electron microscope, and Western blot was used to measure the expression of CaMK II and PKC in the rat hippocampus. **Result:** Compared with the sham group, the synaptic cleft in the hippocampus of model group rats was in fusion and blurred, presynaptic components were in severe edema, synaptic vesicles were severe reduced, the size was uneven, the vast majority of mitochondrial membrane and crest was in fusion, blurred and even disappeared. The

[收稿日期] 20141110(013)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273940);高等学校博士学科点专项科研基金项目(博导类)(20131210110012)

[第一作者] 宋宛珊,博士生,从事中西医结合防治脑病,Tel:18920901593,E-mail:sws19870604@126.com

[通讯作者] *张玉莲,博士,主任医师,从事中西医结合防治脑病,Tel:022-60335418,E-mail:zhyl220@126.com

crest mitochondrial was fractured and had cavitation. However, the three doses of YSHZR improved synaptic morphology to some extent, especially the low-dose group. In addition, compared with the model group, the number of synapses, gap of which was clear, was significantly increased ($P < 0.05$) in low dose group of YSHZR; the number of synapses, gap of which showed partly fusion, had no significant change in each dose group of YSHZR; but the number of synapses, gap of which showed fully fusion, was significantly reduced ($P < 0.05$). Western blot assay found that, compared with the sham group, the expression of CaMK II and PKC in the rat hippocampus of model group was significantly decreased ($P < 0.05$), three dosages of YSHZR could significantly up-regulate the expression of CaMK II and PKC ($P < 0.05$). **Conclusion:** YSHZR may treat AD through improving the synapses morphology and promoting the expression of CaMK II and PKC in the hippocampus.

[Key words] Alzheimer's disease; Yishen Huazhuo recipe; synaptic morphology; calmodulin kinase II; protein kinase C

阿尔茨海默病(AD)又称老年性痴呆,是一种慢性中枢神经系统变性疾病,其临床症状主要包括缓慢发展的记忆障碍、定向障碍、语言障碍等认知功能障碍,其中以记忆减退尤为明显。突触在记忆形成过程发挥了重要作用。在神经系统中,神经元通过突触相互联系而形成神经回路,将信息互相传递与加工^[1]。其中, Ca^{2+} 能够介导突触信号通道的开放^[2],在信息传递及记忆形成过程中发挥至关重要的作用。本课题组临床研究发现,益肾化浊方(YSHZR)可显著改善轻度 AD 患者症状,并对认知功能及日常生活能力有一定的改善作用^[3],但其作用机制尚不明确。本实验将围绕突触形态学以及与 Ca^{2+} 信号通路密切相关的钙调蛋白激酶 II (CaMK II) 和蛋白激酶 C (PKC) 以初步探讨 YSHZR 治疗 AD 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 50 只, SPF 级, 体重约 200 g, 购自北京大学医学部实验动物科学部, 合格证号 SCXK(京)2011-00120。

1.2 药物 YSHZR 组成: 制何首乌 12 g, 女贞子 10 g, 淫羊藿 10 g, 补骨脂 10 g, 石菖蒲 12 g, 炙黄芪 10 g, 川芎 10 g。药物制备方法: 将上述药物按组方比例共称取 4 340 g, 加 1 000 mL 水浸泡 12 h 后, 用 14 000 mL 水于 80 °C 超声提取 30 min, 过滤, 保存滤液; 滤渣再用 1 000 mL 水煎煮 30 min, 过滤, 反复 3 次。将滤液合并, 100 °C 水浴加热, 浓缩至 7 000 mL, 使生药质量浓度为 0.62 g · mL⁻¹。由天津中医药大学制剂中心制备, 药液置于 4 °C 冰箱保存。

1.3 试剂及仪器 β -淀粉样蛋白片段 25-35 ($A\beta_{25-35}$, 批号 042K49501, Sigma 公司), RIPA 裂解液(批号 P0013), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型, 批号 P0009), Alexa Fluor 647 标记山羊抗小鼠

IgG (H + L, 批号 A0473), 超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号 P0018), 均购自碧云天生物技术研究, CaMK II 一抗(批号 ab31704), PKC 一抗(批号 ab31)为 Abcam 公司产品。

H-7500 型透射电子显微镜(日本日立建机株式会社), C 型高速低温离心机(上海安亭科学仪器厂), DYCZ-24DN 型迷你双垂直电泳槽蛋白凝胶电泳仪(北京六一仪器厂), TY-80S(小型)多用脱色摇床(南京大学南达生物技术开发公司), 通用型电泳仪电源(美国 Bio-Rad 公司), Bio-Rad ChemiDox XRS 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), 各量程移液器(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 制备动物模型 $A\beta_{25-35}$ 制备参照 Miguel A 等^[4]的配制方法。造模方法参照杨晓娟等^[5]制备 AD 大鼠模型的方法, ip 5% 的水合氯醛(6 mL · kg⁻¹)麻醉大鼠, 将鼠头固定在脑立体定位仪上保持前后囟在同一水平, 头顶部正中剪开皮毛, 使前囟暴露, 按照《大鼠脑立体定位图谱》进行定位, 在前囟点后方 1.3 mm, 中线旁 2.0 mm 处, 用 5 mL 注射器针头扎一个小孔, 垂直插入 10 μ L 微量注射器, 深度约为 4.0 mm (达侧脑室), 缓慢注射 5 μ L 聚集态的 $A\beta_{25-35}$, 注射 10 min, 留针 10 min 后缝合头皮。术后大鼠每天 im 4×10^4 U 青霉素, 连续注射 3 d。假手术组往大鼠侧脑室注射同 $A\beta_{25-35}$ 等体积的生理盐水, 其余处理同模型组。

2.2 分组与给药 采用随机数字表将 50 只大鼠分成假手术组、模型组、YSHZR 低、中、高剂量组, 共 5 组, 每组 10 只。YSHZR 低、中、高剂量组参照文献[6]中剂量换算方法, 分别按 2.8, 5.6, 11.2 g · kg⁻¹ 剂量 ig 给予 YSHZR 药液, 假手术组与模型组 ig 给予等体积生理盐水, 每日 1 次, 持续 4 周。

2.3 电镜观察大鼠海马区突触形态学 在动物处死后 1 min 内将海马 CA1 区组织放入蜡片上的固定液中,用 4 ℃ 预冷的刀片切成约 1 mm³ 组织块,4% 戊二醛固定 2 ~ 4 h,4 ℃ 保存(或送电镜室),磷酸盐缓冲液清洗 3 次,每次 10 ~ 15 min,再用 1% 四氧化锇固定 1 ~ 2 h,4 ℃ 冰箱保存。清洗后,采用浓度梯度丙酮脱水 2 次,包埋在胶膜或包埋板里,置入烤箱聚合,然后用超薄切片机切成厚约 50 nm 的超薄切片,采用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,置于透射电镜下观察并拍照。在 40 000 倍电镜下观察海马区神经元突触超微结构。在 20 000 倍电镜下观察海马区神经元突触数量和间隙分型,数据以“不同间隙分型的突触数量/突触总数 × 100%”表示。

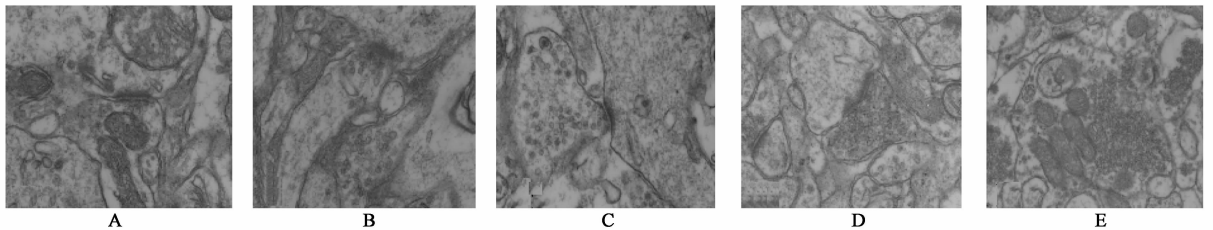
2.4 检测大鼠海马区 CaMK II 和 PKC 的表达 取大鼠海马组织,用匀浆器匀浆,加入适量 RIPA 裂解液,提取总蛋白。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,SDS 上样缓冲液处理蛋白样品,将蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭,一抗 4 ℃ 孵育过夜。第 2 天洗涤后加入二抗孵育 1.5 h,充分洗涤后利用超敏 ECL 化学发光试剂盒处理,于凝胶成像系统观察相关蛋白的表达情况并拍照。图像结

果采用 Image J 软件进行灰度值分析。根据公式“目的条带灰度值 = [A(目的条带灰度值)/O(空白处灰度值)]/β-actin 灰度值”进行计算。

2.5 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行分析处理。数据经正态及方差齐性检验后,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 突触超微结构 假手术组大鼠海马区突触间隙完全清晰,突触前成分轻度水肿,突触小泡轻度减少,大小均一,线粒体小部分嵴和膜融合消失模糊不清;模型组突触间隙融合模糊不清,突触前成分重度水肿,突触小泡重度减少,大小不均一,线粒体绝大部分嵴和膜融合消失模糊不清,有嵴断裂现象及空泡现象;YSHZR 低剂量组突触间隙绝大部分清晰,突触前成分轻度水肿,突触小泡轻度减少,线粒体小部分嵴和膜融合消失;YSHZR 中剂量组突触间隙部分清晰,突触前成分轻中度水肿,突触小泡轻中度减少,线粒体小部分嵴和膜融合消失;YSHZR 高剂量组突触间隙部分清晰,突触前成分轻中度水肿,突触小泡轻中度减少,线粒体小部分嵴和膜融合消失(图 1)。



A. 假手术组;B. 模型组;C. YSHZR 2.8 g·kg⁻¹组;D. YSHZR 5.6 g·kg⁻¹组;E. YSHZR 11.2 g·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 YSHZR 对突触超微结构的影响(透射电镜, × 40 000)

Fig. 1 Effects of YSHZR on the synaptic ultrastructure(Transmission electron microscopy, × 40 000)

3.2 不同间隙分型的突触数量比较 与模型组相比,YSHZR 低剂量组间隙清晰的突触数量百分比显著增加($P < 0.05$);YSHZR 各剂量组间隙部分融合的突触数量百分比无明显变化;YSHZR 各剂量组间隙完全融合的突触数量百分比均显著低于模型组($P < 0.05$),见表 1,图 2。

3.3 YSHZR 对大鼠海马区 CaMK II 和 PKC 蛋白表达的影响 Western blot 实验发现,与假手术组相比,模型组大鼠海马区 CaMK II 和 PKC 的蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$),YSHZR 各剂量组均能显著上调 CaMK II 和 PKC 的蛋白表达($P < 0.05$),见表 2。

表 1 YSHZR 对大鼠海马区不同间隙分型的突触数量的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effects of YSHZR on the percentage of different synaptic gap types in rat hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	间隙清晰 /%	间隙部分 融合/%	间隙完全 融合/%
假手术	-	45.7 ± 5.1 ¹⁾	12.1 ± 14.5	42.1 ± 10.2 ²⁾
模型	-	3.1 ± 6.3	30.2 ± 6.3	66.7 ± 11.8
YSHZR	2.8	56.3 ± 18.5 ¹⁾	16.7 ± 19.3	27.1 ± 8.0 ²⁾
	5.6	36.3 ± 16.5	15.5 ± 18.0	48.2 ± 3.6 ¹⁾
	11.2	43.3 ± 8.2	11.3 ± 13.2	45.4 ± 17.5 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

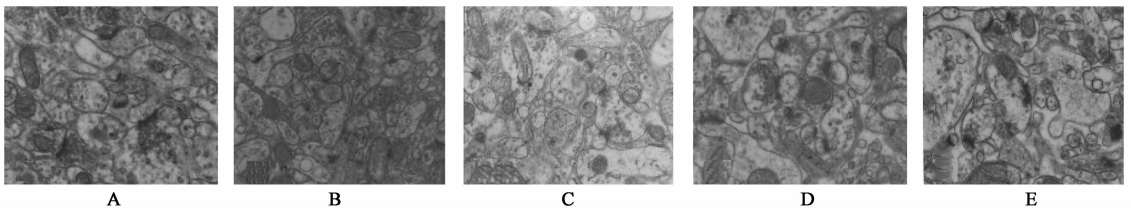


图 2 YSHZR 对大鼠海马神经元突触微观形态的影响 (透射电镜, $\times 20\ 000$)

Fig. 2 Effects of YSHZR on synaptic morphology in rat hippocampus (Transmission electron microscopy, $\times 20\ 000$)

表 2 YSHZR 对大鼠海马区 CaMK II 和 PKC 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of YSHZR on expression of CaMK II and PKC in rat hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CaMK II /β-actin	PKC /β-actin
假手术	-	1.43 ± 0.05 ¹⁾	1.04 ± 0.03 ¹⁾
模型	-	0.79 ± 0.09	0.64 ± 0.03
YSHZR	2.8	1.27 ± 0.03 ¹⁾	1.43 ± 0.07 ¹⁾
	5.6	1.51 ± 0.04 ²⁾	1.55 ± 0.06 ²⁾
	11.2	1.49 ± 0.06 ¹⁾	1.33 ± 0.09 ¹⁾

4 讨论

AD 的发生、发展与中医五脏中肾的关系最为密切,肾精亏虚、髓海不足是 AD 形成的基本病机^[7-8],以肾精亏虚为本、痰浊瘀阻于脑络为标。因此,采用具有补肾益髓、化浊通络、强神益智之功的 YSHZR(女贞子、淫羊藿、补骨脂、石菖蒲、炙黄芪、川芎)治疗可切中病机。本课题组前期临床研究发现,该方能有效改善轻度 AD 症状^[3];实验研究亦发现,方中淫羊藿、补骨脂和女贞子的主要有效成分淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果酸可通过下调海马区淀粉样前体蛋白(APP)及早老素-1(PS1)基因的表达而治疗老年性痴呆^[9]。但全方治疗 AD 的作用机制尚不明确。

AD 的主要临床症状为记忆力减退,突触在记忆形成过程发挥着重要作用^[2]。本研究通过电镜观察大鼠海马区突触形态结构,发现 YSHZR 低、中、高剂量组均能明显改善 AD 大鼠海马区突触形态结构,使突触间隙变得清晰,减轻突触前成分水肿以及线粒体嵴和膜的融合程度,抑制突触小泡减少,其中以低剂量的作用效果尤为明显。比较不同间隙分型的突触数量,发现低剂量的 YSHZR 可有效减少间隙完全融合的突触数量。以上结果表明,低剂量的 YSHZR 可有效改善 AD 大鼠海马区突触的微观形态,保护突触微观结构,为 AD 记忆力的改善提供完整的结构基础。

在大脑神经回路中,沉默突触仅具有传递信息的结构而没有传递信息的功能,其激活可以有效改善 AD 的学习记忆能力,且与 Ca²⁺ 信号通路中各关键因子有关^[10]。研究发现,AD 小鼠海马区存在沉默突触,且影响了学习记忆及认知功能障碍^[11]。若使其转化为功能性突触,则可增强突触的功能可塑性与结构稳定性,有效增强学习记忆能力^[12]。Ca²⁺ 进入细胞后可激活 CaMK II,促进 CaMK II 与 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体结合,进一步促进 Ca²⁺ 内流,而 Ca²⁺ 介导的一系列信号通路的变化是突触传递功能长时程增强(LTP)产生的关键步骤^[13-14]。此外,Ca²⁺ 信号同时可激活细胞内的胞外信号调节激酶(ERK/MAPK)信号通路,维持海马神经元的存活以及部分皮层神经通路中的 LTP^[15-16]。因此,CaMK II 和 ERK/MAPK 通路相关的 PKC 在 Ca²⁺ 内流与增强突触传递功能过程发挥着重要作用。本研究发现,YSHZR 各剂量均可以显著促进 AD 大鼠海马区 CaMK II 与 PKC 的表达,且中剂量效果最佳。

在研究过程中发现,YSHZR 低剂量对 AD 大鼠海马区神经元突触形态学保护作用最佳,而中剂量对于 CaMK II 与 PKC 表达的影响最为显著。其原因可能包括:①突触微观结构对药物的敏感性更强,但耐受力较差;②Ca²⁺ 的激活存在剂量依赖性,中剂量能够最大程度的激活 Ca²⁺,促进 CaMK II 及 PKC 蛋白的表达。综合整体疗效,低剂量的 YSHZR 可一定程度上激活 Ca²⁺,唤醒沉默突触,并保护突触超微结构,为发挥传递功能提供良好的结构基础。因此,低剂量 YSHZR 是目前最佳的用药剂量。

通过以上研究,初步明确了 YSHZR 治疗 AD 的作用机制与改善突触形态学和调节 Ca²⁺ 信号通路有关。但记忆力形成与修复的过程和机制极其复杂,YSHZR 改善 AD 患者记忆力的作用机制还有待进一步深入探讨,本研究为其奠定了初步的基础和参考。

[参考文献]

[1] Tang Y P, Shimizu E, Dube G R, et al. Genetic

- enhancement of learning and memory in mice [J]. Nature, 1999, 401(6748):63-69.
- [2] Mamiya T, Yamada K, Miyamoto Y, et al. Neuronal mechanism of nociceptin-induced modulation of learning and memory: involvement of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors [J]. Mol Psychiatry, 2003, 8(8):752-765.
- [3] 傅凯丽, 林翠茹, 张玉莲, 等. “YSHZR”治疗轻度阿尔茨海默病15例临床研究[J]. 江苏中医药, 2014, 44(8):28-29.
- [4] López-Toledano M A, Shelanski M L. Neurogenic effect of β -amyloid peptide in the development of neural stem cells. [J]. J Neurosci, 2004, 24(23):5439-5444.
- [5] 杨晓娟, 张生林, 陈芸, 等. 新型复合式老年痴呆动物模型的建立[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(4):318-320.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:202-203.
- [7] 郭振球. 老年期痴呆的证治学研究[J]. 中医药研究, 1991, 8(1):16-18.
- [8] 傅仁杰, 罗社文. 中医药治疗老年性呆病的临床研究述评[J]. 北京中医药大学学报, 1994, 17(3):2-8, 71.
- [9] 张玉莲, 刘爽, 张琳琳, 等. 补肾中药有效成分对SAMP8小鼠海马APP及PS1基因表达的影响[J]. 天津中医药, 2012, 29(1):59-61.
- [10] Petralia R S. Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations [J]. Neuroscience, 2010, 167(1):68-87.
- [11] Grilli M. Exposure to an enriched environment selectively increases the functional response of the pre-synaptic NMDA receptors which modulate noradrenaline release in mouse hippocampus [J]. Neurochem, 2009, 110(5):1598-1606.
- [12] Polley D B, Kvasnak E, Frostig R D, et al. Naturalistic experience transforms sensory map in the adult cortex of caged animals [J]. Nature, 2004, 429(6987):67-71.
- [13] Bodhinathan K, Kumar A, Foster T C. Intracellular redox state alters NMDA receptor response during aging through Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II [J]. J Neurosci, 2010, 30(5):1914-1924.
- [14] Zhang M, Storm D R, Wang H. Bidirectional synaptic plasticity and spatial memory flexibility require Ca^{2+} stimulated adenylyl cyclases [J]. Neurosci, 2011, 31(28):10174-10183.
- [15] Ikemoto S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory [R]. Neurosci Biobehav Rev, 2010, 35(2):129-150.
- [16] Villarreal J S, Barea-Rodriguez E J. ERK phosphorylation is required for retention of trace fear memory [J]. Neurobiol Learn Mem, 2006, 85(1):44-57.

[责任编辑 聂淑琴]