

丹溪痛风方对阿尔茨海默病小鼠血脑屏障通透性和海马 β 淀粉样蛋白₁₋₄₀ 的影响及机制

张晓杰, 费洪新, 刘得水, 张英博
(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的:**探讨丹溪痛风方(DXTFF)对阿尔茨海默病(AD)小鼠血脑屏障(BBB)通透性和海马 β 淀粉样蛋白₁₋₄₀ ($A\beta_{1-40}$)的影响及机制。**方法:**小鼠随机分成正常组,模型组,多奈哌齐组($0.001\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),DGP高、中、低剂量组($52,26,13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。采用小鼠双侧海马注射 $A\beta_{1-42}$ 和腹腔注射 D-半乳糖诱导 AD 小鼠。DGP 连续治疗 35 d 后取材。检测小鼠脑含水量和伊文氏蓝(EB)含量,海马电镜结构和脏器指数。采用双抗体夹心法测定海马和血清 $A\beta_{1-40}$,海马晚期糖基化终末产物受体(RAGE)和低密度脂蛋白受体相关蛋白 1(LRP1)。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测海马 RAGE 和 LRP1 mRNA 表达。**结果:**与正常组比较,模型组 AD 小鼠脑含水量,EB 含量,海马 $A\beta_{1-40}$ 含量及海马 RAGE mRNA 水平明显升高($P < 0.05$),血清 $A\beta_{1-40}$,海马 LRP1 mRNA,脾指数和胸腺指数均明显降低($P < 0.05$),海马 CA1 区神经元形态较规则,神经元较小,细胞核圆形且萎缩,双层核膜不清晰,细胞质不丰富,细胞器较少;与模型组比较,DGP 组脑含水量,EB 含量,海马 $A\beta_{1-40}$ 及 RAGE mRNA 水平明显降低($P < 0.05$),血清 $A\beta_{1-40}$,海马 LRP1,脾指数和胸腺指数明显增加($P < 0.05$),海马神经元结构明显改善。**结论:**DGP 通过下调海马 RAGE 和上调海马 LRP1 表达来降低 AD 小鼠 BBB 通透性和海马 $A\beta_{1-40}$ 。

[关键词] 丹溪痛风方;阿尔茨海默病;血脑屏障;糖基化终末产物受体;低密度脂蛋白受体相关蛋白 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0118-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220118

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1335.032.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 13:35

Effect and Mechanisms of Danxi Tongfeng Fang on Permeability of Blood Brain Barrier and β -Amyloid₁₋₄₀ of Hippocampus in Alzheimer's Disease Mice

ZHANG Xiao-jie, FEI Hong-xin, LIU De-shui, ZHANG Ying-bo
(Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and relevant mechanisms of Danxi Tongfeng Fang (DXTFF) on the permeability of blood brain barrier (BBB) and β -amyloid₁₋₄₀ ($A\beta_{1-40}$) of hippocampus in Alzheimer's disease (AD) mice. **Method:** Mice were randomly divided into normal group, model group, donepezil ($0.001\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and DXTFF high-dose ($52\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medial-dose ($26\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and low-dose ($13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups. Through injection with $A\beta_{1-42}$ into bilateral hippocampus and intraperitoneal injection with D-galactose, the AD mice model was established. The mice were killed after continuous treatment for 35 days. Water content and EB level in brain tissue, electron microscopy of hippocampus and organ coefficients of AD mice were measured. Biochemical methods were used to determine the content of $A\beta_{1-40}$ in hippocampus and serum, the content of receptor of advanced glycation and products (RAGE) and low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in hippocampus. Real-time PCR methods were used to determine the expression of RAGE and

[收稿日期] 20151124(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173576,81373777,81173599);黑龙江省自然基金项目(H201354);黑龙江省教育厅项目(12521624,12531788,12531790)

[第一作者] 张晓杰,博士,教授,博士生导师,从事痴呆、肿瘤、抑郁和痛风研究,Tel:13514641639,E-mail:zhangxiaojie2098@163.com

LRP1 mRNA in hippocampus. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed significant increases in water content and EB level in brain tissue, content of $A\beta_{1-40}$ in hippocampus and content of RAGE in hippocampus ($P < 0.05$), and significant decreases in $A\beta_{1-40}$ in serum, LRP1 in hippocampus, spleen index and thymus index ($P < 0.05$), regular neuronal morphology in hippocampus CA1, smaller neurons, round and atrophic nucleus, nuclear double karyotheca, insufficient cytoplasm and fewer organelle. Compared with the model group, in the DXTFF group, water content in brain, EB level in brain, $A\beta_{1-40}$ and RAGE level in hippocampus significantly decreased ($P < 0.05$), and $A\beta_{1-40}$ level in serum, LRP1 level in hippocampus, organ coefficients of splenic and thymus significantly increased ($P < 0.05$), with notable improvement in neuronal structure of hippocampus. **Conclusion:** DXTFF reduces the permeability of BBB and $A\beta_{1-40}$ in hippocampus by down-regulating RAGE and up-regulating LRP1 in hippocampus.

[**Key words**] Danxi Tongfeng Fang; Alzheimer's disease; blood brain barrier; receptor of advanced glycation end products; low-density lipoprotein receptor related protein 1

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的神经系统退行性疾病之一^[1]。AD 表现为 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $A\beta$) 沉积^[2] 形成老年斑 (senile plaque, SP)。 $A\beta$ 来源于 β -淀粉样蛋白前体蛋白^[3], $A\beta$ 主要分 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ 参与形成 SP, $A\beta_{1-40}$ 可促进 $A\beta_{1-42}$ 成熟且通过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 转运。 $A\beta$ 可影响晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 表达^[4], $A\beta$ 跨血管内皮细胞转运与 RAGE 和低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP1) 有关^[5]。丹溪痛风方 (Danxi Tongfeng Fang, DXTFF) 是朱丹溪经过长期临床实践总结研究的著名方剂之一, 对痛风性疾病有明显的治疗效果^[6], 本课题组的前期工作显示 DXTFF 通过抗炎作用治疗小鼠急性痛风性关节炎 (AGA)^[7], 兔 AGA^[8], 大鼠 AGA^[9] 等。DXTFF 抗 AD 方面研究国内外未见文献报道。基于这些, 本课题开展 DXTFF 对 AD 小鼠 BBB 通透性和海马 $A\beta_{1-40}$ 影响及机制的研究。

1 材料

1.1 动物 雄性清洁级 7 周龄昆明小鼠, 体重 (23 ± 2) g, 42 只, 购买于黑龙江中医药大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (黑) 2013-0012。实验动物中心李宝龙副主任负责动物的常规饲养、给药, 动物自由摄取食物及其饮用水。

1.2 药物及试剂 多奈哌齐 (重庆植恩药业有限公司, 批号 20141201), DXTFF (黑龙江中医药大学中医药研究院周忠光教授购买于黑龙江中医药大学附属第一医院, 其中 DXTFF 全方天南星 15 g, 苍术 15 g, 黄柏 15 g, 防己 15 g, 威灵仙 15 g, 泽泻 15 g, 车前子 15 g, 川芎 10 g, 桃仁 10 g, 红花 10 g, 羌活 20 g, 桂枝 20 g, 土茯苓 25 g, 共 200 g), $A\beta_{1-40}$, RAGE 和 LRP1 酶联免疫试剂盒 (南京建成生物工程研究所,

批号 20140401), $A\beta_{1-42}$ 和 D-半乳糖 (美国 Sigma 公司), 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 Applied Biosystems step one plus 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (美国应用生物系统公司), 6100 型 RT-雷杜酶标仪 (美国 RT 公司), PLZOZ-S 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), TCNAI-G2 型透射电镜 (荷兰公司), STW-1 型脑立体定位仪 (成都仪器厂)。

2 方法

2.1 AD 模型复制 小鼠水合氯醛麻醉后, 剪去头顶部毛发, 固定小鼠头部和四肢, STW-1 型脑立体定位仪定位小鼠海马区, 微量加样器双侧脑室海马区连续注入 10 μ g 的 $A\beta_{1-42}$ ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 针头留下 15 min 后包扎小鼠, 同时小鼠 *ip* D-半乳糖 ($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常组小鼠双侧脑室和 *ip* 等量生理盐水。

2.2 分组和给药 小鼠随机分为正常组, 模型组, 多奈哌齐组, DXTFF 高、中、低剂量组, 共 42 只, 每组 7 只。DXTFF 由田明教授制备成水煎剂、干粉, 低温保存。正常组和模型组 *ig* 给予生理盐水, 多奈哌齐组 *ig* 给予多奈哌齐 $0.001 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, DXTFF 高、中、低剂量组分别 *ig* 给予 DXTFF 52, 26, 13 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续 *ig* 给药 35 d。

2.3 测定脑含水量 小鼠末次给药 2 h 后, 断头处死, 取全脑, 去除小脑和脑干, 生理盐水洗涤, 用滤纸吸去表面液体, 电子天平称脑重为脑湿重, 随后用电热恒温箱 ($52 \text{ }^\circ\text{C}$) 恒温烘烤 72 h, 称量小鼠脑重为脑干重。

$$\text{脑含水量} = [(\text{脑湿重} - \text{脑干重}) / \text{脑湿重}] \times 100\%$$

2.4 测定 BBB 通透性 BBB 通透性用脑伊文氏蓝 (EB) 含量来表示。小鼠末次给药 2 h 后, 尾静脉注射 2% EB, 水合氯醛麻醉小鼠, 剪开腹腔、胸腔, 针头

扎入左心室灌注生理盐水约 70 mL,冰台上迅速取脑,称重并记录脑湿重,脑放入甲酰胺溶液内浸泡,45 °C 避光孵育 72 h,匀浆,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。酶标仪上 630 nm 处测定上清液吸光度 A。根据 EB 标准曲线求出 EB 含量,EB 含量用 EB 浓度/脑湿重($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)来表示。

2.5 透射电镜测定海马 CA1 区结构 小鼠末次给药 2 h 后,左心室灌注生理盐水 70 mL,灌注 2.5% 戊二醛 70 mL,取材小鼠脑海马 CA1 区、戊二醛固定、四氧化锇固定、脱水、包埋、切片等,透射电镜观察 AD 小鼠海马 CA1 区结构。

2.6 测定脏器指数 小鼠末次给药 2 h 后,电子天平称取小鼠体重,各组小鼠迅速断头处死,取材小鼠脾、胸腺、肝和肾,电子天平称取小鼠脾、胸腺、肝和肾,计算脏器指数。

$$\text{脏器指数}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \text{脏器质量}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

2.7 酶联免疫法测定海马 $A\beta_{1-40}$, 血清 $A\beta_{1-40}$, 海马 RAGE 和 LRP1 小鼠末次给药 2 h 后,眼科镊子摘除眼球,取眼部混合血,取小鼠海马,匀浆,静置海马匀浆液和血液,TGL-16G 型台式离心机 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,分装,-80 °C 保存。在酶标仪上 450 nm 波长处测定 A,绘制标准曲线,求得小鼠海马 $A\beta_{1-40}$,血清 $A\beta_{1-40}$,海马 RAGE 和 LRP1。

表 1 DXTFF 对 AD 小鼠脑含水量的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effect of DXTFF on water content of brain tissue in AD mice($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	脑湿重/mg	脑干重/mg	脑含水量/%
正常	-	235.35 ± 12.65	60.53 ± 10.25	74.14 ± 5.01
模型	-	222.03 ± 23.84	33.20 ± 6.34	84.86 ± 3.63 ¹⁾
多奈哌齐	0.001	234.58 ± 22.91	56.68 ± 10.46	75.86 ± 3.72 ²⁾
DXTFF	52	229.74 ± 26.14	57.22 ± 14.85	75.43 ± 4.04 ²⁾
	26	224.79 ± 20.85	52.39 ± 9.88	76.57 ± 4.58 ²⁾
	13	227.88 ± 17.51	39.63 ± 4.27	82.57 ± 1.90

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~6 同)。

3.2 对 AD 小鼠脑 EB 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑 EB 含量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,多奈哌齐组,DXTFF 高、中剂量组小鼠脑 EB 含量明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对 AD 小鼠海马 CA1 区神经元电镜结构的影响 透射电镜观察可见正常组小鼠海马神经元形态规则,细胞核大而圆,核仁清晰,神经元形态正常;模型组小鼠海马神经元形态较规则,神经元较小,细胞核圆形且萎缩,双层核膜不清晰;多奈哌齐组,DXTFF

2.8 Real-time PCR 法测定海马 RAGE 和 LRP1 mRNA 表达 小鼠末次给药 2 h 后,麻醉小鼠,处死小鼠,冰台上迅速取小鼠海马。按照试剂盒说明书,应用 Trizol 试剂盒提取海马总 RNA,逆转录合成 cDNA,进行 PCR 扩增。RAGE 引物:上游引物 5'-AAAACGACAACCCAGGCGT-3',下游引物 5'-ATTCTCTGGCATCTCCGCTTC-3';LRP1 引物:上游引物 5'-CCGACTGGCGAACAAATACAC-3',下游引物 5'-ATCGGCTTTGTTGCACGTG-3'; β -肌动蛋白(β -actin)引物:上游引物 5'-CGTGCCTGACATCA AAGAGAA-3',下游引物 5'-AACCGCTCGTTGCC AATAGT-3'。引物由中国上海捷瑞生物工程有限公司合成。PCR 反应体系参数:50 °C 2 min,95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,共 40 个循环。扩增产物以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法表示 RAGE 和 LRP1 mRNA 相对表达量。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间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 对 AD 小鼠脑含水量的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑含水量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,多奈哌齐组,DXTFF 高、中剂量组小鼠脑含水量明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

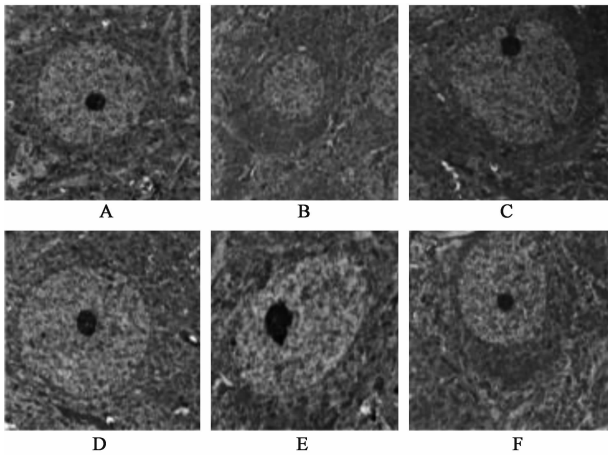
高、中剂量组小鼠海马神经元形态比较规则,神经元较大,细胞核大而椭圆,核仁清晰;DXTFF 低剂量组小鼠海马神经元较小,核膜不清晰。见图 1。

3.4 对 AD 小鼠海马 CA1 区神经元细胞质电镜结构的影响 透射电镜观察可见正常组小鼠海马神经元细胞质丰富,粗面内质网较多,核糖体颗粒清晰;模型组小鼠海马神经元细胞质不丰富,细胞器较少;经过 DXTFF 治疗后,多奈哌齐组,DXTFF 高、中、低剂量组小鼠海马神经元细胞器不同程度地增加。见图 2。

表 2 DXTFF 对 AD 小鼠脑 EB 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of DXTFF on EB level of brain tissue in AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	EB 质量浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	EB 含量/ $\mu g \cdot g^{-1}$
正常	-	0.21 ± 0.11	0.89 ± 0.49
模型	-	$0.41 \pm 0.15^{1)}$	$1.85 \pm 0.70^{1)}$
多奈哌齐	0.001	$0.21 \pm 0.10^{2)}$	$0.94 \pm 0.50^{2)}$
DXTFF	52	$0.25 \pm 0.12^{2)}$	$1.10 \pm 0.59^{2)}$
	26	$0.26 \pm 0.08^{2)}$	$1.17 \pm 0.32^{2)}$
	13	0.36 ± 0.16	1.61 ± 0.73



A. 正常组; B. 模型组; C. 多奈哌齐 $0.001 g \cdot kg^{-1}$ 组; D. DXTFF $52 g \cdot kg^{-1}$ 组; E. DXTFF $26 g \cdot kg^{-1}$ 组; F. DXTFF $13 g \cdot kg^{-1}$ 组 (图 2 同)

图 1 DXTFF 对 AD 小鼠海马 CA1 区结构的影响 (电镜扫描, $\times 2550$)

Fig. 1 Effect of DXTFF on electron microscopy of hippocampal CA1 sector in AD mice (scanning electron microscope, $\times 2550$)

表 3 DXTFF 对 AD 小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effect of DXTFF on organ coefficients in AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	脾指数	胸腺指数	肝指数	肾指数
正常	-	3.35 ± 0.22	2.26 ± 0.18	39.26 ± 1.92	14.55 ± 0.79
模型	-	$2.74 \pm 0.13^{1)}$	$1.79 \pm 0.11^{1)}$	$40.23 \pm 3.67^{4)}$	14.96 ± 0.98
多奈哌齐	0.001	$3.24 \pm 0.23^{2)}$	$2.22 \pm 0.23^{2)}$	39.15 ± 1.68	14.56 ± 1.21
DXTFF	52	$3.17 \pm 0.31^{2)}$	$2.17 \pm 0.25^{2)}$	39.32 ± 2.39	14.56 ± 1.45
	26	$3.12 \pm 0.26^{2)}$	$2.13 \pm 0.20^{2)}$	39.35 ± 2.09	14.45 ± 0.95
	13	2.85 ± 0.26	1.89 ± 0.16	39.76 ± 2.27	14.28 ± 0.82

LRP1 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 多奈哌齐组, DXTFF 高、中剂量组小鼠海马 RAGE 明显降低且海马 LRP1 明显增加 ($P < 0.05$)。见表 5。

3.8 对 AD 小鼠海马 RAGE 和 LRP1 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠海马 RAGE mRNA 明显增加且 LRP1 mRNA 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 多奈哌齐组, DXTFF 高、中剂

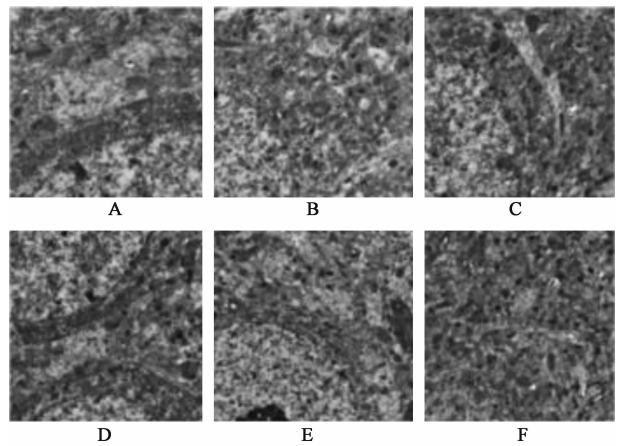


图 2 DXTFF 对 AD 小鼠海马 CA1 结构的影响 (电镜扫描, $\times 16500$)

Fig. 2 Effect of DXTFF on electron microscopy of hippocampal CA1 sector in AD mice (scanning electron microscope, $\times 16500$)

3.5 对 AD 小鼠脏器指数的影响 与正常组比较, 模型组小鼠脾指数和胸腺指数明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 多奈哌齐组, DXTFF 高、中剂量组小鼠脾指数和胸腺指数明显升高 ($P < 0.05$)。各组间肝指数和肾指数比较改变不明显。见表 3。

3.6 对 AD 小鼠海马 $A\beta_{1-40}$ 和血清 $A\beta_{1-40}$ 的影响 与正常组比较, 模型组小鼠海马 $A\beta_{1-40}$ 明显增加且血清 $A\beta_{1-40}$ 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 多奈哌齐组, DXTFF 高、中剂量组小鼠海马 $A\beta_{1-40}$ 明显降低且血清 $A\beta_{1-40}$ 明显增加 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.7 对 AD 小鼠海马 RAGE 和 LRP1 的影响 与正常组比较, 模型组小鼠海马 RAGE 明显增加且海马

量组小鼠海马 RAGE mRNA 明显降低且海马 LRP1 mRNA 明显增加 ($P < 0.05$)。见表 6。

4 讨论

实验制备 AD 模型方法包括很多, 例如海马区域注射 $A\beta_{1-42}^{[10-13]}$, 海马区域注射 $A\beta_{1-42}$ 及 *ip* D-半乳糖^[14]等。基于本课题组选择 $A\beta_{1-42}$ 及 D-半乳糖制备 AD 模型的方法比较成熟, 因此本实验采用 $A\beta_{1-42}$

表 4 DXTFF 对 AD 小鼠海马 $A\beta_{1-40}$ 和血清 $A\beta_{1-40}$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 4 Effect of DXTFF on $A\beta_{1-40}$ of hippocampus and serum in AD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	海马 $A\beta_{1-40}$	血清 $A\beta_{1-40}$
正常	-	197.58 ± 76.53	165.58 ± 36.19
模型	-	326.41 ± 51.87 ¹⁾	93.29 ± 28.55 ¹⁾
多奈哌齐	0.001	200.09 ± 52.59 ²⁾	144.34 ± 48.39 ²⁾
DXTFF	52	211.87 ± 87.25 ²⁾	142.76 ± 51.52 ²⁾
	26	217.58 ± 69.87 ²⁾	150.15 ± 29.84 ²⁾
	13	290.61 ± 45.31	104.36 ± 37.71

表 5 DXTFF 对 AD 小鼠海马 RAGE 和 LRP1 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 5 Effect of DXTFF on RAGE and LRP1 of hippocampus in AD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RAGE/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	LRP1/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
正常	-	18.98 ± 5.52	80.38 ± 13.45
模型	-	34.43 ± 4.89 ¹⁾	46.99 ± 6.40 ¹⁾
多奈哌齐	0.001	19.85 ± 6.22 ²⁾	75.05 ± 15.52 ²⁾
DXTFF	52	21.04 ± 8.06 ²⁾	73.63 ± 14.07 ²⁾
	26	22.18 ± 4.99 ²⁾	69.04 ± 14.79 ²⁾
	13	29.66 ± 5.31	50.34 ± 15.39

表 6 DXTFF 对 AD 小鼠海马 RAGE 和 LRP1 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 6 Effect of DXTFF on RAGE and LRP1 mRNA of hippocampus in AD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RAGE mRNA	LRP1 mRNA
正常	-	1.007 4 ± 0.124 8	1.010 8 ± 0.162 2
模型	-	1.425 1 ± 0.272 7 ¹⁾	0.489 8 ± 0.122 9 ¹⁾
多奈哌齐	0.001	1.152 6 ± 0.259 0 ²⁾	0.738 9 ± 0.173 9 ²⁾
DXTFF	52	1.143 4 ± 0.183 7 ²⁾	0.807 1 ± 0.262 6 ²⁾
	26	1.124 9 ± 0.213 3 ²⁾	0.751 6 ± 0.226 8 ²⁾
	13	1.338 8 ± 0.284 5	0.585 5 ± 0.151 6

和 D-半乳糖双重因素制备 AD 模型。

本研究为了探讨 DXTFF 对 AD 小鼠 BBB 通透性和海马 $A\beta_{1-40}$ 的影响及机制,采用 DXTFF 为施加因素开展实验研究。透射电镜观察可见正常组小鼠海马神经元基本结构正常;模型组小鼠海马神经元形态不规则,细胞质较少,说明模型组小鼠海马神经元损伤,模型建立成功,适合选择海马区域注射 $A\beta_{1-42}$ 及腹腔注射 D-半乳糖建立 AD 模型;经过 DXTFF 治疗后,小鼠海马神经元形态较为规则,细胞器不同程度增加,说明海马神经元结构和功能得到不同程度地恢复。

研究表明, $A\beta$ 异常沉积会引起炎症反应并增加

BBB 通透性^[15], BBB 通透性使用 EB 含量进行表示^[16]。因此实验测定了小鼠脑含水量及 EB 含量,以此评价 DXTFF 对 AD 小鼠 BBB 通透性的影响。结果显示,经过 DXTFF 治疗后, DXTFF 高、中剂量组小鼠脑含水量和 EB 含量降低,提示 DXTFF 高、中剂量降低了 BBB 通透性,减少水分进入脑,减轻脑水肿。AD 伴有免疫功能低下^[17],免疫器官的相对质量可初步评价免疫功能。结果显示,经过 DXTFF 治疗后,小鼠脾指数和胸腺指数增加,提示免疫器官的相对质量增加,参与体液免疫和细胞免疫的细胞数量增加,说明 DXTFF 增加 AD 小鼠的免疫功能。另外实验测定肝指数和肾指数,各组间比较无差异,说明 DXTFF 无副作用。提示 DXTFF 可以改善 AD 小鼠的免疫功能,并且 DXTFF 无副作用。

研究表明, BBB 血管内皮细胞参与 $A\beta$ 清除, $A\beta$ 清除异常致 $A\beta$ 沉积于脑^[18-19]。AD 脑内存在大量 $A\beta$, $A\beta_{1-40}$ 可在特殊转运蛋白的参与下通过 BBB 进行转运,从而影响脑组织内 $A\beta_{1-40}$ 的含量。实验结果显示,经过 DXTFF 治疗后, DXTFF 高、中剂量组小鼠脑组织海马 $A\beta_{1-40}$ 降低,提示 DXTFF 降低脑组织 $A\beta_{1-40}$, 减少了脑组织 $A\beta_{1-42}$, 减缓脑组织形成 SP, 同时血清 $A\beta_{1-40}$ 增加,提示 $A\beta_{1-40}$ 通过某种特殊转运机制将脑 $A\beta_{1-40}$ 跨 BBB 外排进入血液当中,增加了血清 $A\beta_{1-40}$, 而与脑组织跨 BBB 转运 $A\beta_{1-40}$ 的蛋白质是 RAGE 和 LRP1, 因此有必要开展 RAGE 和 LRP1 的测定。

实验通过酶联免疫及其 Real-time PCR 方法检测了与 $A\beta_{1-40}$ 转运密切相关的 RAGE 和 LRP1。结果表明,经过 DXTFF 治疗后, DXTFF 高、中剂量组小鼠海马 RAGE 表达降低,海马 LRP1 表达增加,提示 $A\beta_{1-40}$ 进入脑减少,而 $A\beta_{1-40}$ 转运出脑增加,说明脑 $A\beta_{1-40}$ 减少,减缓 $A\beta_{1-42}$ 成熟,减轻 AD。这些说明 DXTFF 可以通过调控 RAGE 和 LRP1 的表达来改善 BBB 的通透性及其海马 $A\beta_{1-40}$ 。

综上所述, DXTFF 通过下调 RAGE 和上调 LRP1 来改善 AD 小鼠 BBB 通透性、降低海马 $A\beta_{1-40}$ 水平, DXTFF 抗 AD 的具体机制还有待于进一步实验研究。

[参考文献]

[1] Brkic M, Balusu S, Van Wonerghem E, et al. Amyloid β oligomers disrupt blood-CSF barrier integrity by activating matrix metalloproteinases [J]. J Neurosci, 2015, 35 (37): 12766-12778.

- [2] Ca M, Mg C, Lp S, et al. Leptin in Alzheimer's disease [J]. Clin Chim Acta, 2015, 450:162-168.
- [3] Wan Z, Mah D, Simtchouk S, et al. Role of amyloid β in the induction of lipolysis and secretion of adipokines from human adipose tissue [J]. Adipocyte, 2014, 4 (3) : 212-216.
- [4] Wan W, Cao L, Liu L, et al. $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced leakage in an *in vitro* blood-brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins [J]. J Neurochem, 2015, 134 (2) : 382-393.
- [5] Qosa H, Levine H, Keller J N, et al. Mixed oligomers and monomeric amyloid- β disrupts endothelial cells integrity and reduces monomeric amyloid- β transport across hCMEC/D3 cell line as an *in vitro* blood-brain barrier model [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842 (9) :1806-1815.
- [6] 刘丹, 施仁潮. 丹溪痛风方治疗痛风性疾病的研究进展 [J]. 中医药学报, 2013, 41 (4) :125-127.
- [7] 周忠光, 丑小月, 费洪新, 等. 丹溪痛风方对小鼠急性痛风性关节炎的实验研究 [J]. 中医药学报, 2015, 43 (1) :59-62.
- [8] 李宝龙, 韩玉生, 刘旭, 等. 丹溪痛风加减方对 MSU 致家兔急性痛风性关节炎的防治作用 [J]. 中医药学报, 2011, 39 (3) :45-47.
- [9] 朴成玉, 房城, 安柏松, 等. 丹溪痛风胶囊对大鼠急性痛风性关节炎 IL-12 及 COX-2 表达的影响 [J]. 中医药信息, 2012, 29 (4) :91-92.
- [10] Liu H, Deng Y, Gao J, et al. Sodium hydrosulfide attenuates beta amyloid induced cognitive deficits and neuroinflammation via modulation of MAPK/NF- κ B pathway in rats [J]. Curr Alzheimer Res, 2015, 12 (7) : 673-683.
- [11] Yang H, Wang S, Yu L, et al. Esculentoside A suppresses $A\beta_{1-42}$ -induced neuroinflammation by down-regulating MAPKs pathways *in vivo* [J]. Neurol Res, 2015, 37 (10) :859-866.
- [12] Vossel K A, Xu J C, Fomenko V, et al. Tau reduction prevents $A\beta$ -induced axonal transport deficits by blocking activation of GSK3 β [J]. J Cell Biol, 2015, 209 (3) :419-433.
- [13] 费洪新, 高音, 孙丽慧, 等. 黄芪多糖对阿尔茨海默病小鼠海马组织的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35 (16) :4426-4429.
- [14] 费洪新, 高音, 孙丽慧, 等. 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 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (7) :91-94.
- [15] Wan W, Cao L, Liu L, et al. $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced leakage in an *in vitro* blood-brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins [J]. J Neurochem, 2015, 134 (2) : 382-393.
- [16] Miao X M, Cheng S X, Yang Z, et al. Therapeutic bloodletting at Jing-well points combine hypothermia attenuated acute cerebral edema after traumatic brain injury in rats [J]. Chin J Appl Physiol, 2015, 31 (3) : 249-253.
- [17] Richartz E, Stransky E, Batra A, et al. Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease [J]. J Psychiatr Res, 2005, 39 (5) : 535-543.
- [18] Pflanzner T, Kuhlmann C R, Pietrzik C U. Blood-brain-barrier models for the investigation of transporter and receptor-mediated amyloid- β clearance in Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2010, 7 (7) :578-590.
- [19] Erickson M A, Banks W A. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33 (10) : 1500-1513.

[责任编辑 周冰冰]